

1 03081



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

“CARACTERIZACION DEL PATRON DE
DESPLEGAMIENTO DE LA TRIOSA FOSFATO
ISOMERASA (TIM) DE *Trypanosoma brucei* CON
UREA Y CLORURO DE GUANIDINIO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
BIOLOGA MARIA ELENA CHANEZ CARDENAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. RUY PEREZ MONTFORT

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Ruy Pérez Montfort en el Instituto de Fisiología Celular y en colaboración con el Dr. D. Alejandro Fernández Velasco del Laboratorio de Fisicoquímica y Diseño de Proteínas, Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto fue apoyado por los donativos IN206297 e IN200600 (R. P.-M), IN112198 (D.A.F.-V) y PAEP, UNAM 201403 (M.E.C.-C) y una beca para estudios de Doctorado otorgada por la DGAPA.

A Edgar,

*Por estar aquí para mí.
Por ser el mejor compañero
para compartir la vida. Por
el amor y la complicidad con
que apoyas mis sueños, pero
sobre todo, por ser el amor
de mi vida.*

A Josefina y Roberto,
Por construir el barco.
Porque todo lo que hago
es resultado de cada
uno de sus esfuerzos y de su amor por mí.

A Eduardo y Germán, mi infancia, mis
recuerdos, la vida misma. Los quiero.

A mis sobrinos Daniel, Tadeo, Mario y
Alexa. Porque su llegada a esta vida me ha
hecho sentir el amor más grande,
inexplicable e intenso que se puede sentir
por alguien a quien apenas se conoce.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A Roberto Chánez Quiroz y Germán Chánez Cárdenas. In memoriam.

No perdono a la muerte enamorada,
no perdono a la vida desatenta,
no perdono a la tierra ni a la nada.

Miguel Hernández

Agradecimientos

Al Dr. Ruy Pérez Montfort, por la oportunidad de trabajar en un proyecto tan maravilloso. Por el apoyo y las enseñanzas. Ruy: porque un buen pedazo de mi vida ha transcurrido desde que te conozco y siempre me has acompañado.

Al Dr. D. Alejandro Fernández Velasco, por dirigir la parte de la caracterización por desnaturalización de la TbTIM. Por adoptarme y apoyarme en todo momento. Por el uso de recursos, por todo lo que aprendí, por la solidaridad, los desvelos, las discusiones y la formación.

Al Dr. Roberto Coria Ortega, por enseñarme biología molecular, en el salón y en el laboratorio, entre muchas otras cosas. Pero sobre todo porque siempre ha tenido confianza en mí.

Al Dr. Miguel Costas Basín por la beca de ayudante de investigador. Por la crítica exhaustiva y la discusión de los datos, por presionar todos los días y por los proyectos juntos que espero tengan excelentes frutos. Gracias Miguel por apoyarme y apoyarnos.

Al Dr. Ruy Pérez Montfort, Dr. D. Alejandro Fernández Velasco, Dr. Andrés Hernández Arana, Dr. Arturo Rojo Domínguez, Dr. Armando Gómez Puyou, Dra. Bertha Espinoza y Dr. Roberto Hernández por haber revisado la tesis y por sus valiosos comentarios para mejorarla.

A la Dra. Gloria Saab Rincón, por permitirnos trabajar con su mutante monomérica de la cual dependen resultados cruciales de este trabajo. Por el trabajo intenso y el tiempo dedicado. Porque las colaboraciones no se acaben.

A los viejos y nuevos compañeros del laboratorio, Nallely Cabrera, Laila Gutiérrez, Marcela Varela, Gloria Hernández, Santiago Ávila, María José y Rosalía, Pedro Ostoa y Emma Saavedra. Gracias por todo.

A Nallely, Marce y Gloria. Por ser mis amigas queridas, por permitirme compartir la vida con ustedes. Por su cariño, sus consejos, por su apoyo, por reír conmigo y también por haber secado muchas veces mis lágrimas. Por la complicidad y lo divertido de estar juntas. Las quiero muchísimo.

A Lino Méndez: Muchísimas gracias Lino por toda su ayuda y porque siempre conté con su disposición para ayudar y trabajar. Por el café y la plática de las mañanas que extraño muchísimo.

A la Dra. Rosa Estela Navarro quien siempre ha estado pendiente de mí. Gracias amiga por tus consejos y tu cariño. Tu visión de la vida siempre ha sido una importante luz para mí.

A los integrantes del laboratorio 306 oriente del Instituto de Fisiología Celular, que me permitieron trabajar, aprender y tuvieron infinita paciencia conmigo.

A todos y cada uno los integrantes del laboratorio de "Fisioquímica y diseño de proteínas" de la Facultad de Medicina de la UNAM por varios años de trabajo juntos. Al Dr. Mario Calcagno, Dr. Alejandro Sosa y Dra. Georgina Garza Ramos por su interés, las discusiones en los seminarios, por su apoyo.

Al Biól. Hugo Nájera Peña con quién realicé la cromatografía de exclusión molecular. Por la discusión de los resultados, por las propuestas, las discusiones. Al Biól. Gerardo Pérez Hernández. Gracias Gerardo por toda tu ayuda, en todo. Podría hacer una lista inmensa pero no terminaría. Gracias a los dos por salvarme siempre de mis líos computacionales y resolver todas y cada una de mis dudas. Por su paciencia y disposición y sobre todo por la amistad.

Al Dr. Rafael Zubillaga Luna y Dr. Enrique García Hernández, por sus tiempo, sus enseñanzas y por mis incursiones en el difracción circular.

A Adrián Kornhauser, por todos sus consejos, ayuda y arreglar los desperfectos de mi compu, y por los ratos agradabilísimos que hemos compartido.

A los integrantes de los seminarios del Dr. Gómez-Puyou y la Dra. Tuena: Geo, Lety, Jesús, David, Alejandro, Gerardo, Lenin, Gloria, Edgar, Hugo, Alfredo, Horacio, Gabriel y Viviana. Por las acaloradas discusiones y todo lo que aprendí con ustedes.

Todos tenemos en el fondo la misma tendencia, es decir, a irnos viendo como el resultado y el compendio de lo que nos ha ocurrido y de lo que hemos logrado y de lo que hemos realizado, como si fuera sólo eso lo que conforma nuestra existencia. Y olvidamos casi siempre que las vidas de las personas no son sólo eso: cada trayectoria se compone también de nuestras pérdidas y nuestros desperdicios, de nuestras omisiones y nuestros deseos incumplidos, de lo que una vez dejamos de lado o no elegimos, o no alcanzamos, de las numerosas posibilidades que en su mayoría no llegaron a realizarse –todas menos una, a la postre– de nuestras vacilaciones y nuestras ensoñaciones, de los proyectos frustrados y los anhelos falsos y tibios, de los miedos que nos paralizaron, de lo que abandonamos o nos abandonó a nosotros. Las personas tal vez consistimos, en suma, tanto en lo comprobable y cuantificable y recordable como en lo más incierto, indeciso y difuminado, quizá estemos hechos en igual medida de lo que fue y de lo que pudo ser.

Javier Marias

Mañana en la batalla piensa en mí

Pero quiero agradecer aquí, a los que fueron, son y se quedaron para siempre:

A mis abuelos Rosenda y José, que fueron maestros rurales y a quienes quiero tanto. A mis papás Josefina y Roberto, que fueron maestros normalistas. Y a todos mis maestros que me hicieron lo que soy. A mis amigos alfabetizadores. En honor a la profesión más grande de todos los tiempos que no implica necesariamente estudiar para maestro. Por eso quiero agradecer a todas aquellas personas que no se contentaron con pasar de largo por mi vida, sino que me enseñaron una, dos o mil cosas.

A Martha Rocha y Mireya Alcaraz que son un gran tesoro para mí, por su apoyo incondicional, porque las quiero y admiro. Porque todos nuestros sueños se cumplan y los sigamos compartiendo juntas.

A mis queridísimos tíos Rosario Cárdenas y Juan González Guevara por todo su cariño y apoyo, por ser parte fundamental de mi vida. Y a mis primos adorados Rosario, Rubén, José, Malú y Mario y a los pequeños sobrinos Mario y Mariana. La vida, definitivamente ha sido más bonita con ustedes.

A Emma Cháñez.

A Elizabeth Contreras, a la abuela Josefina, a Jano y Jesús Vázquez, y a Erika Pastrana, por todo su apoyo y por ya muchos años de compartir. Con todo mi amor a Alexa Vázquez, por traer por equipaje bocanadas de aire puro y esperanzas.

A Mireya Alcaraz, Martha Rocha, Francisco Alvarez, Manuel Aguilar, mis amigos de toda la vida (literalmente). Gracias por haber estado siempre en los momentos más felices y también en los más dolorosos de mi vida. Sin ustedes todo hubiera sido más difícil. Gracias Francisco por el curso intensivo de Fisicoquímica, sin el cual ni siquiera hubiera podido entrar a estudiar el Doctorado.

A mi amigo más grande, Edgar. Y a todos los amigos que conocí a través de él: Soledad Funes, Tania Ramírez, Pável Ramírez, Jorge Pedrajo, Eduardo Gazol, Yareli Torres y Sara Hernández, con todo mi cariño, por quedarse a vivir en mi corazón.

A Francisco y Sandra, Manuel e Ileana, Eduardo y Yareli, Tania y Pablo, Sole, Pável y Jorge. Porque sigamos aprendiendo y sigamos juntos en este difícil arte de ser y hacer pareja.

A la familia Aguilar-Tamayo, Manuel, Tania, Federico, Ernesto y muy especialmente a Irene y Manuel papá que son parte fundamental de mi vida y mi persona.

A la familia Zubillaga-Martín: Rafa, Nancy, Darío y Diego. Gracias por la amistad, los padrísimos viajes, el gran apoyo y por permitirnos compartir con su familia.

A Adrián Aldrete Quiñones. Querido Adrián, gracias por amar tu trabajo y porque la vida vista contigo es más clara. Por ser un maestro de la vida y enseñarme a disfrutarla y a atragantarme de ella sin miedo.

A mis alumnos de la Facultad de Ciencias, por enseñarme a dar clases.

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2

Capítulo 1. Introducción

1.1	El plegamiento de las proteínas	3
1.2	Estudios de plegamiento de proteínas <i>in vitro</i>	5
1.3	Desnaturalización de las proteínas	6
1.4	Agentes desnaturalizantes	7
1.5	La urea y el cloruro de guanidinio como desnaturalizantes	7
1.6	Técnicas para seguir las transiciones estructurales durante el desplegamiento de las proteínas	9
1.7	Fluorescencia	10
1.8	Fluorescencia intrínseca	10
1.9	Proteínas oligoméricas	12
1.10	Barriles α/β y su plegamiento	13
1.11	La triosafosfato isomerasa	16
1.12	Estudios de desnaturalización de la TIM	20
1.13	Objetivos	24

Capítulo 2. Material y Métodos

2.1	Construcción de las mutantes	25
2.1.1	Construcción de la doble mutante W12F/W193F	26
2.1.2	RMMO-1TIM	27
2.2	Sobreexpresión y purificación de la TbTIM recombinante y las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F	27
2.2.1	Sobreexpresión	28
2.2.2	Purificación de la TbTIM	28
2.3	Caracterización de la TbTIM y de las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F	29
2.3.1	Ensayos de estabilidad a la dilución de la TbTIM y W12F/W193F	30
2.3.2	Obtención de los espectros de fluorescencia y dicroísmo circular (DC) para la TbTIM, W12F, W159F y W12F/W193F	30
2.4	Experimentos de desnaturalización inducidos por urea e hidrocloreuro de guanidina y analizados por fluorescencia y dicroísmo circular	30
2.5	Unión de ANS	31
2.6	Actividad catalítica de las muestras incubadas en urea e hidrocloreuro de guanidina	32
2.7	Ensayos de reversibilidad de la TbTIM	33
2.8	Cromatografía de exclusión molecular y determinación del	

	Radio de Stokes para la desnaturalización con GdnHCl	33
2.8.1	Calibración de la columna	34
2.8.2	Muestras experimentales: TbTIM y RMOO-TIM	35
2.9	Superficie de exposición al solvente y distancias entre los residuos triptofano en la TbTIM	35
2.10	Estimación de estructura secundaria	35
2.11	Cálculo de los valores de $C_{\frac{1}{2}}$ para los patrones de desnaturalización con GdnHCl	36

Capítulo 3. Resultados

3.1	Sobreexpresión de la TbTIM y las mutantes W12F, W159F, W193F y W12F/W193F.	37
3.2	Purificación de TbTIM y de las mutantes	37
3.3	Propiedades catalíticas de la TbTIM y de las mutantes	38
3.4	Propiedades espectroscópicas de la TbTIM y de las mutantes	40
3.5	Ensayos de estabilidad a la dilución de TbTIM, W12F y W12F/W193F	44
3.6	Ensayos de reversibilidad de la TbTIM y W12F/W193F	47
3.7	Desplegamiento de la TbTIM y de las mutantes W12F y W12F/W193F	53
3.7.1	Desplegamiento inducido por urea	54
3.7.2	Desplegamiento inducido por GdnHCl	62
3.8	Cromatografía de exclusión (CEM-FPLC)	68
3.8.1	Calibración de la columna	68
3.8.2	Características hidrodinámicas de la TbTIM	70

Capítulo 4. Discusión

4.1	Caracterización de la TbTIM y las mutantes construidas y estabilidad a la dilución	77
4.2	Determinación del grado de reversibilidad en el proceso de despliegamiento de la TbTIM	78
4.3	Desplegamiento de TbTIM, W12F y W12F/W193F inducido por urea	83
4.4	Desplegamiento de TbTIM, W12F y W12F/W193F inducido por GdnHCl	85
4.5	Obtención del patrón de desnaturalización para la TbTIM por CEM-FPLC	87
4.6	Dilucidación del patrón de desnaturalización de la TbTIM por fluorescencia intrínseca utilizando las mutantes W12F y W12F/W193F	90
4.7	Plegamiento de diferentes TIMs y la hipótesis de la conservación del plegamiento de proteínas homólogas	93

Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas 98

Referencias bibliográficas	104
----------------------------	-----

Abreviaturas:

EDTA, ácido etilendiamin-tetraacético; **DTT**, Ditioneitol; **TEA**, Trietanolamina; **TED**, amortiguador que contiene TEA, EDTA y DTT. **ANS**, 1-anilino 8-naftaleno sulfonato; **MES** (ácido 2-[N-Morfolino] etansulfónico; **PMSF**, fenilmetilsulfonilfluoruro; **DMSO**, dimetilsulfóxido; **SDS-PAGE**, docecil sulfato de sodio- electroforesis en gel de poliacrilamida; **CM**, carboximetil; **DC**, dicroísmo circular; **GdnHCl**, hidrocloreto de guanidinio; **SCM**, centro espectral de masa, del inglés "spectral center of mass"; **IF**, fluorescencia intrínseca; **CEM**, cromatografía de exclusión molecular; **FPLC**, cromatografía líquida de alta presión, del inglés "fast pressure liquid chromatography"; **TIM**, triosafosfato isomerasa; **TbTIM**, triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*, **TcTIM**, triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*, y **yTIM**, triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*. **W12F**, mutante de TbTIM cuyo triptofano 12 está sustituido por fenilalanina; **W159F**, mutante de TbTIM cuyo triptofano 159 está sustituido por fenilalanina., y **W12F/W193F**, mutante de TbTIM en la que los triptofanos 12 y 193 están sustituidos por fenilalanina. **R_s**, Radio de Stokes; **F**, fenilalanina; **W**, triptofano; **A**, agregados, **D**, dímero nativo; **D***,dímero parcialmente desplegado, **M***, intermediario monomérico; **U**, monómero desplegado.

Resumen

En este trabajo se caracterizó el desplegamiento de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) y de dos mutantes con residuos triptofano (W) sustituidos por fenilalanina (F). El desplegamiento de la TbTIM y las mutantes W12F y W12F/W193F inducido por urea y por cloruro de guanidinio (GdnHCl) Se siguió por difracción circular (DC), fluorescencia, actividad catalítica y fluorescencia de 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS). Para ambos desnaturizantes se observó que el patrón de desplegamiento no es un proceso de dos estados, y que la sustitución de los residuos W desestabiliza la conformación nativa de ambas mutantes con respecto a la proteína silvestre. La exposición al solvente de diferentes regiones de la proteína durante el proceso de desplegamiento se caracterizó espectroscópicamente con la comparación de los datos obtenidos para la TbTIM y las mutantes. El análisis de los datos de fluorescencia permitió proponer qué regiones se exponen al solvente a lo largo del desplegamiento.

Para la desnaturización con GdnHCl, se determinó que el proceso de desplegamiento involucra la presencia de dos intermediarios. Usando como referencia las características hidrodinámicas de la mutante monomérica RMM0-1TIM, obtenidas por cromatografía de exclusión molecular proponemos el estado de asociación de los intermediarios: D^* , un dímero parcialmente expandido y M^* , un intermediario monomérico. Por otro lado, se observaron agregados de alto peso molecular a quienes proponemos como causantes de la irreversibilidad del proceso.

1. Introducción

1.1 El plegamiento de las proteínas

La síntesis de proteínas se lleva a cabo en el proceso de traducción del RNA mensajero. La cadena polipeptídica recién sintetizada posee como funciones primarias la adquisición espontánea de la estructura tridimensional nativa y en el caso de proteínas oligoméricas, la asociación de subunidades (Jaenicke, 1987). En el plegamiento *in vivo*, existen factores auxiliares como chaperonas y catalizadores como la isomerasa de disulfuros y la peptidil protil *cis-trans* isomerasa, que asisten el proceso de plegamiento. Sin embargo, estos factores sólo facilitan el plegamiento productivo en el ambiente celular, pero no lo dirigen.

Conocer el mecanismo por el cual las proteínas adquieren su estructura tridimensional para tener el arreglo espacial que les permite obtener su estado nativo y funcional es un problema aún no resuelto. A partir de los resultados de la renaturalización por oxidación-reducción de la ribonucleasa (Anfinsen, 1973), se propuso que la estructura nativa está determinada por la secuencia de aminoácidos y las interacciones de ésta con el solvente.

El plegamiento de las proteínas puede compararse con una reacción química, en la cual el reactante (proteína desplegada) se convierte en producto (proteína plegada) y puede o no haber intermediarios. En una reacción química unimolecular existe un paso limitante cuando la proteína pasa a través de un estado de transición. A diferencia de una reacción química, en la que el estado de transición es una conformación única, en el plegamiento de las proteínas éste es un ensamble de conformaciones (Sali *et al.*, 1994).

El plegamiento de las proteínas puede considerarse como una transición entre fases (desplegada, nativa e intermediarios), en donde cada fase posee muchas conformaciones

(Pande *et al.*, 1998). La proteína nativa, es un sistema dinámico que fluctúa entre un número determinado de conformaciones y no una estructura única (Jaenicke, 1987).

Levinthal (1968) planteó el siguiente problema: si el proceso de plegamiento a partir del estado desplegado de una proteína se hiciera por la búsqueda azarosa entre las diferentes conformaciones, el tiempo que se requeriría para obtener una proteína nativa sería demasiado largo, tan largo como millones de años. Esta observación a la que se le conoce como paradoja de Levinthal plantea la existencia de rutas preferenciales de plegamiento, es decir, de todas las conformaciones posibles, sólo algunas son relevantes, aquellas cinéticamente accesibles en la escala de tiempo del plegamiento (Levinthal, 1968).

Se propuso también la existencia de estados intermediarios transitorios que de alguna manera dirigieran la ruta de plegamiento de las proteínas (Matthews, 1991). Si fuera posible identificar y establecer la estructura de estos estados, se podrían determinar los factores que guían el plegamiento de las proteínas a través de rutas productivas.

Algunos datos experimentales permitieron proponer un modelo llamado "jerárquico". En este modelo se plantea que durante los primeros milisegundos del plegamiento la molécula se compacta y aparecen elementos de estructura secundaria. La siguiente etapa involucra la formación de puentes de hidrógeno estables y la exclusión de algunos aminoácidos hidrofóbicos del solvente. En esta etapa inicia la formación de la estructura terciaria, y pueden presentarse intermediarios con estructura muy semejante a la nativa. Los últimos eventos en este modelo de plegamiento involucran la formación del resto de las interacciones no covalentes que mantienen la conformación nativa, siendo la etapa más lenta del proceso de plegamiento (Matthews, 1991, 1993).

La propuesta de la existencia de rutas de plegamiento dio origen a la visión considerada como clásica, que involucra una secuencia definida de estados que van de la conformación

desnaturalizada a la nativa (Kim & Baldwin, 1982). Mientras que esta visión involucra una secuencia lineal de eventos, una nueva propuesta conocida como la “nueva visión del plegamiento”, basada en los resultados del uso de modelos de mecánica estadística, sustituye el concepto de ruta de plegamiento por el de diagramas de embudo. Los modelos mecánico-estadísticos reconocen que los diferentes estados de plegamiento son en realidad ensambles de conformaciones. En el modelo de embudo, el plegamiento es un proceso de flujos paralelos de estas diferentes conformaciones.

La idea de un embudo indica que las conformaciones adoptadas por la cadena poseen menor energía libre, reduciendo progresivamente su "dimensionalidad" en el espacio conformacional accesible. El embudo se va estrechando hasta llegar a la conformación nativa (Baldwin, 1995, Dill & Chan, 1997).

1.2 Estudios de plegamiento de proteínas *in vitro*

Para seguir los diferentes pasos a lo largo del patrón de plegamiento, se ha utilizado el análisis cinético y termodinámico de los procesos de desplegamiento y de replegamiento *in vitro* (Jaenicke & Rudolph, 1989). Mucho se ha discutido sobre la validez de la comparación del plegamiento *in vitro* vs. *in vivo*, sobre todo por el hecho de que la renaturalización inicia a partir de una cadena polipeptídica completa, mientras que el plegamiento *in vivo* es un proceso que involucra el crecimiento de la cadena del amino al carboxilo terminales por lo que se ha sugerido que ésta se va plegando conforme se va sintetizando (Jaenicke, 1987). Para considerar que la comparación del plegamiento *in vitro* e *in vivo* es válida, se deben cumplir dos condiciones. La primera es que la cinética de renaturalización esté dentro del rango de tiempo en que ocurre el plegamiento *in vivo*. La

segunda es que el producto final de la renaturalización sea indistinguible del estado nativo inicial (Jaenicke, 1987, Jaenicke & Rudolph, 1989).

En términos de la termodinámica de equilibrio, el plegamiento se puede definir como la transición reversible entre el estado desnaturalizado y el nativo. La reversibilidad es un requisito indispensable para este tipo de análisis del proceso de plegamiento. Sin embargo, no todas las proteínas presentan un proceso de renaturalización reversible.

1.3 Desnaturalización de las proteínas

El cambio en la conformación de una proteína debida a efectos en las interacciones no-covalentes, sin cambio alguno en las interacciones covalentes se conoce como desnaturalización. La estructura nativa de las proteínas se conserva bajo condiciones físicas apropiadas de pH, temperatura, presión etc. El cambio en las propiedades del solvente puede originar la pérdida de la estructura nativa o desnaturalización, la cual implica la desactivación de la proteína y puede estar acompañada de disociación.

Los cambios moderados en las condiciones ambientales pueden no tener un gran efecto sobre la estructura nativa de las proteínas; sin embargo, si el cambio en alguna variable excede un valor crítico la proteína se desnaturaliza cooperativamente (Fernández-Velasco, 1995).

Dentro de los objetivos que existen para estudiar la desnaturalización de las proteínas, se encuentra determinar la estabilidad conformacional de éstas bajo diferentes condiciones de desnaturalizante, o bien, seguir la ruta de plegamiento estudiando los procesos de desnaturalización y/o renaturalización de la proteína (Hamaguchi, 1992).

1.4 Agentes desnaturalizantes

Los desnaturalizantes usados para el desplegamiento de las proteínas globulares son el cloruro de guanidinio (GdnHCl), urea, dodecil sulfato de sodio (SDS), aumento o disminución de temperatura, extremos de pH, aumento de la presión hidrostática y menos frecuentemente se usan el cloruro de litio, tiocianato de potasio, cloruro de calcio y tiocianato de guanidina (Tanford, 1970, Jaenicke & Rudolph, 1989).

Los experimentos de desnaturalización de las proteínas se basan en que la estructura de las proteínas cambia conforme se incrementa una condición desnaturalizante. De esta manera al aumentar gradualmente cualquiera de las condiciones desnaturalizantes, se modifica la proporción entre el número de moléculas de proteína que se encuentran en el estado nativo y el desnaturalizado, obteniéndose así una curva o perfil de desnaturalización. En este tipo de curvas, se determina la fracción de proteína nativa que permanece (siguiendo una señal sensible a la conformación de la proteína) mientras se aumenta una condición desnaturalizante.

1.5 La urea y el cloruro de guanidinio como desnaturalizantes

La urea y el cloruro de guanidinio (GdnHCl) son dos desnaturalizantes útiles para los estudios de desplegamiento tanto en condiciones de equilibrio como cinéticos, ya que se sigue la transición entre el estado nativo (N) y los estados completamente desnaturalizados de la proteína (Hamaguchi, 1992). El mecanismo por el cual actúan la urea y el GdnHCl no se conoce totalmente, a pesar de ser ampliamente usados como desnaturalizantes de proteínas. No se conoce si la acción del desnaturalizante es directa y análoga a un mecanismo de unión de ligando, o bien, si es indirecta e involucra un cambio en las propiedades del solvente. Existen algunos trabajos que estudian evidencias directas de la

interacción de los dos desnaturizantes con la molécula proteica, como el trabajo de Tanford sobre la transferencia de los aminoácidos de soluciones acuosas a soluciones con desnaturizante (Tanford, 1970) y los estudios calorimétricos de las interacciones de la proteína con urea y GdnHCl (Makhatadze & Privalov, 1992).

Aparentemente, el mecanismo de unión del desnaturizante es el causante de la desestabilización de la proteína nativa. En este mecanismo, los agentes estabilizadores tienen baja interacción con la superficie de la macromolécula disminuyendo la solubilidad de la proteína. En contraste, los desnaturizantes como la urea y el GdnHCl interaccionan con la superficie de la proteína, especialmente con aquellas superficies no polares que tienden a estar dentro de la molécula (los valores de energía libre de transferencia de cadenas hidrofóbicas es negativa) e incrementan la solubilidad de la proteína. Ambos desnaturizantes incrementan la solubilidad de moléculas polares y no polares y disminuyen la magnitud de las interacciones hidrofóbicas. Incluso, la interacción con las superficies polares y no polares es más favorable que su interacción con el agua, lo cual se ha medido por la energía libre de transferencia de agua a una solución de desnaturizante (Creighton, 1993).

El GdnHCl es un desnaturizante más fuerte que la urea. La energía libre para la transferencia de aminoácidos y péptidos de agua a soluciones acuosas de urea y GdnHCl (ΔG_t) es de dos a tres veces mayor para GdnHCl que para urea. Esto indica que las cadenas laterales de los aminoácidos tienen mayor afinidad por GdnHCl que por urea, y que la desnaturización por ésta requiere de dos a tres veces más concentración de desnaturizante (Hamaguchi, 1992).

1.6 Técnicas para seguir las transiciones estructurales durante el desplegamiento de las proteínas.

Al desnaturalizar una proteína por aumento de la concentración de un desnaturalizante como urea, GdnHCl o cualquiera de los desnaturalizantes mencionados anteriormente, es necesario seguir una señal que sea sensible a los cambios en la conformación de la proteína nativa. La determinación de la función biológica y del estado de asociación de la proteína son recursos experimentales importantes. La medición de la actividad enzimática es un método sensible, rápido y específico para caracterizar las transiciones durante el proceso de desnaturalización y plegamiento de las proteínas, y se basa en el principio de que para que la proteína lleve a cabo su función, se requiere que la proteína se encuentre en su estado nativo (Jaenicke & Rudolph, 1989).

Además de la actividad catalítica, existen otras técnicas para medir los cambios estructurales durante el desplegamiento, las más frecuentes son la espectroscopía diferencial de UV, la fluorescencia y el dicroísmo circular (DC). Otras técnicas usadas son la dispersión óptica rotatoria (DOR), la resonancia magnética nuclear (RMN), la viscosidad y el intercambio deuterio-hidrógeno (Pace *et al.*, 1989, Dobson *et al.*, 1994).

.....En general, los métodos espectroscópicos, se usan para caracterizar el comportamiento de una proteína bajo diferentes condiciones del solvente y también para comparar las características de moléculas relacionadas como son proteínas homólogas o mutantes de la proteína a estudiar. La espectroscopía puede dar información sobre los cambios en la estructura secundaria y terciaria de la proteína en solución. Por otro lado, se requieren cantidades pequeñas de proteína para realizar estas mediciones y las muestras pueden ser recuperadas después del experimento (Schmid, 1989, Eftink, 1994).

1.7 Fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia posee características dinámicas y estáticas que permiten seguir las transiciones de desplegamiento inducidas por calor, presión o agentes químicos como urea y GdnHCl. Uno de los usos prácticos de la fluorescencia es obtener información cinética y termodinámica de las transiciones de macromoléculas, como las reacciones de plegamiento y desnaturalización (Eftink, 1994, Lakowicz, 1999).

La emisión de fluorescencia se observa cuando un electrón regresa de un estado excitado al estado basal. Esta emisión ocurre a mayores longitudes de onda, cuando se compara con el espectro de absorción del mismo cromóforo, debido a que una parte de la energía se pierde en procesos no-radiativos como las transiciones vibracionales.

Los fluoróforos usados en bioquímica pueden ser naturales (intrínsecos) como los aminoácidos aromáticos, las flavinas, la vitamina A, la clorofila y el NADH, o extrínsecos como el cloruro de dansilo, la pireína, la fluoresceína y el 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS). Los fluoróforos extrínsecos pueden unirse covalente o no covalentemente a la molécula de interés.

La fluorescencia refleja las interacciones del fluoróforo con las moléculas circundantes, especialmente durante el tiempo de vida del estado excitado. Es muy sensible y varios parámetros de ésta como la longitud de onda de máxima emisión ($\lambda_{\text{máx}}$), la intensidad y el tiempo de vida, pueden ser afectados. (Eftink, 1994., Campbell, 1984, Lakowicz, 1999).

1.8 Fluorescencia intrínseca

La fluorescencia intrínseca de las proteínas se debe a la presencia de los fluoróforos naturales fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptofano (W). La mayor parte de la señal de fluorescencia de las proteínas se debe a la fluorescencia de los residuos W, ya que su

absorción y la eficiencia cuántica de la emisión son considerablemente mayores que los de F y Y (Schmid, 1989). Cuando se usa una longitud de onda de excitación de 280 nm, la emisión se debe a los residuos Y y W, pero es posible excitar selectivamente a los residuos W a 295 nm.

Generalmente las proteínas tienen pocos W. Estos residuos tienen un grupo indol que es muy sensible al ambiente. En un medio hidrofóbico como el interior de una proteína plegada, la emisión de los W se lleva a cabo a longitudes de onda menores (el grupo indol en hexano tiene una $\lambda_{\text{máx}}$ de 320 nm) que la que ocurre cuando estos residuos se exponen al solvente (350 nm corresponde a la $\lambda_{\text{máx}}$ del W cuando está en una solución acuosa). De tal manera que es posible seguir los cambios en la intensidad de la fluorescencia y el cambio de la longitud de onda de máxima emisión, al aumentar una condición desnaturizante en la que se exponen los residuos W al solvente (Lakowicz, 1999).

La fluorescencia de los W se ha usado ampliamente para seguir la movilidad interna en el ambiente de regiones particulares de la proteína; sin embargo, existen dificultades para interpretar las señales de fluorescencia de las proteínas que tienen más de un W. Para estas proteínas es muy difícil resolver la contribución de cada uno de los fluoróforos lo cual limita la interpretación de las características dinámicas de las cadenas laterales durante los estudios de desplegamiento de las proteínas (Royer *et al.*, 1993). La solución a este problema, en teoría, es la sustitución de cadenas laterales fluorescentes como el W por otro residuo (preferentemente aromático pero menos fluorescente) por mutagénesis dirigida, para posteriormente seguir la fluorescencia remanente. Este tipo de estrategia ha permitido obtener datos de asignación de la contribución de la fluorescencia de un W en particular (Waldman *et al.*, 1987), o bien dilucidar algunos aspectos sobre la estructura y función de

alguna proteína (Mogi *et al.*, 1989). En proteínas sin W, es posible insertar un W en una región de interés y poder seguir esa región específica de la proteína durante la unión de ligandos (Kilhoffer *et al.*, 1988). En el caso de los estudios de desnaturalización o renaturalización de las proteínas que sólo poseen un W, es posible asignar cambios a lo largo de estos procesos a regiones de la proteína y proponer modelos de desnaturalización (Royer *et al.*, 1993; Mann *et al.*, 1993).

1.9 Proteínas oligoméricas

La estructura nativa de muchas proteínas está formada por varias cadenas polipeptídicas asociadas a través de interacciones no covalentes. La estructura cuaternaria se refiere a esta disposición, y se define como el arreglo geométrico y estequiométrico de ensamblajes moleculares formados por monómeros estructurados. Las cadenas polipeptídicas que forman el complejo pueden ser iguales o diferentes, y su tamaño puede variar entre 50 y 3000 residuos de aminoácidos. Las estructuras más comunes son los dímeros y los tetrameros, aunque hay trímeros, hexámeros, dodecámeros y complejos todavía mayores (Jaenicke, 1987).

El plegamiento de las proteínas oligoméricas involucra interacciones intra e intersubunidad. En este proceso debe de existir un acomodo adecuado de las interfases de las subunidades. La velocidad de plegamiento de las proteínas oligoméricas puede estar limitada por la asociación de subunidades.

El uso de proteínas oligoméricas para estudios de plegamiento involucra una mayor dificultad que para las proteínas monoméricas, ya que presentan procesos cinéticos complejos y en ocasiones procesos irreversibles. Estas proteínas tienen una gran tendencia

a la precipitación y la agregación durante los estudios de desnaturalización, provocando la irreversibilidad total o parcial del proceso (Garel, 1992, Jaenicke, 1996)

Debido a esto, los estudios de plegamiento de proteínas se han llevado a cabo mayoritariamente con proteínas monoméricas. Las enzimas que presentan un nivel de asociación mayor han sido estudiadas con menos frecuencia. Sin embargo, las reacciones que se llevan a cabo en la célula son catalizadas en una gran parte por proteínas oligoméricas y la función realizada por la mayoría de estas proteínas está regulada por su estructura cuaternaria. Seguir las rutas de desnaturalización y/o renaturalización para oligómeros puede dar información sobre el proceso de asociación que origina la estructura cuaternaria. Los homodímeros son el modelo más sencillo de oligomerización, ya que la adquisición del estado nativo incluye tanto el proceso de plegamiento como el de asociación.

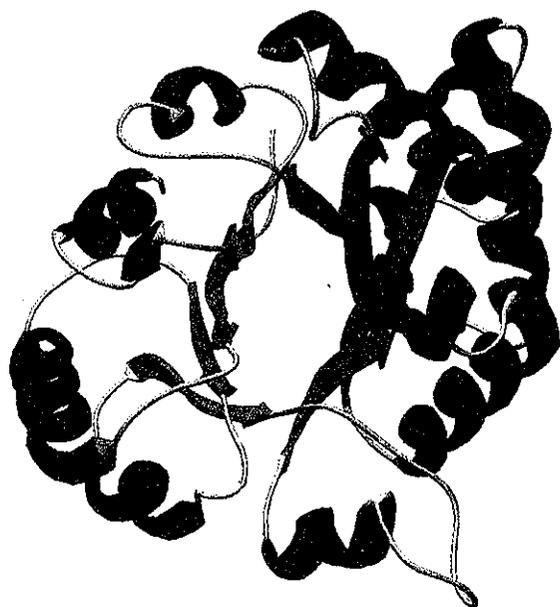
1.10 Barriles α/β y su plegamiento

La estructura de barril α/β , cuyo prototipo es la triosafosfato isomerasa (TIM), es uno de los dominios estructurales más grandes y estables. Se requiere de por lo menos 200 residuos para su formación. La longitud de los barriles α/β varía entre 225 residuos en la fosfogluconato aldolasa hasta cerca de 400 residuos en la xilosa isomerasa. Esta estructura se ha encontrado en muchas proteínas con secuencia y función totalmente diferentes. En muchas enzimas la cadena polipeptídica completa forma el dominio de barril α/β , aunque en otras con cadenas más largas hay dominios adicionales que presentan otras estructuras (Branden, 1991, Farber, 1993). El barril está formado por una región de 8 hebras β paralelas arregladas como las duelas de un barril y conectadas por medio de α -hélices que

se encuentran por fuera de la región central de hebras β (Figura 1). Hay también residuos que forman regiones en asa que conectan a las hojas β con las α -hélices. Las asas son de longitud variable y constituyen regiones que participan tanto en la unión de sustrato como en la actividad catalítica, a diferencia del papel de estabilidad estructural que tienen las hebras β y las α -hélices (Branden & Tooze, 1991).

Los estudios de plegamiento de los barriles α/β han reportado la presencia de por lo menos un intermediario en el plegamiento de la subunidad α de la triptofano sintasa de *Salmonella* (Stackhouse, 1988) y de *E. coli* (Stackhouse, 1988, Gualfetti, 1999), la fosforibosil antranilato isomerasa de *S. cerevisiae* (yPRAI) (Eder & Kirschner, 1992) y de *E. coli* (ePRAI) (Jassanoff *et al.*, 1994), la indol-3-glicerol fosfosintasa (IGPS) de *Sulfolobus solfataricus* (Andreotti *et al.*, 1997) y de *E. coli* (Sánchez del Pino & Fersht, 1997). La aldolasa monomérica de *Staphylococcus aureus* es un caso en el que no se presenta ningún intermediario (Rudolph *et al.*, 1992).

Los estudios cinéticos y al equilibrio para la renaturalización de barriles α/β , ha permitido proponer un mecanismo general para su plegamiento. Tanto para la yPRAI (Eder & Kirschner, 1992) y la ePRAI (Jassanoff *et al.*, 1994) como la subunidad α de la triptofano sintetasa, los resultados muestran que un primer fragmento que comprende la región (α_1 - α_6), es estable y con una estructura definida. En la yPRAI este fragmento puede asociarse estequiométricamente con el segundo fragmento (α_7 - α_8) para formar un complejo activo. Se ha propuesto que el mecanismo de plegamiento involucra un intermediario con las primeras 6 unidades prácticamente plegadas de forma nativa y con las dos últimas unidades parcialmente desnaturalizadas (Eder & Kirschner, 1992), es decir, un mecanismo 6+2 en el que el paso limitante para la renaturalización es la fusión del fragmento (α_7 - α_8).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Página anterior

Figura 1. Esquema de la estructura de barril α/β . En rojo se muestran las α -hélices, en azul las hebras β y en gris las asas.

1.11 La triosafosfato isomerasa

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica que cataliza la interconversión entre gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a través de un intermediario *cis*-enediol. Las propiedades de esta enzima han sido estudiadas con detalle (Knowles, 1991). La reacción que realiza la TIM determina en gran parte la eficiencia de la glucólisis ya que de las dos triosas (GAP y DHAP) solo el GAP continúa en la ruta glucolítica. En la reacción ocurren dos enolizaciones, de la DHAP al enediol y del GAP al enediol. La enzima media las protonaciones y desprotonaciones necesarias para llevar a cabo las dos enolizaciones utilizando una base y un ácido catalíticos, así como un asa proteica que une y estabiliza al intermediario de la reacción. La TIM ha sido considerada un catalizador perfecto (Knowles, 1991, Albery & Knowles, 1976). Las propiedades catalíticas de la TIM han sido estudiadas con gran detalle (Rose *et al.*, 1990, Knowles & Albery, 1977), y se ha establecido que *in vivo*, los pasos limitantes de la velocidad de la reacción son la unión de sustrato y la liberación de producto, controlados por la difusión (Blacklow *et al.*, 1988).

La TIM es un homodímero formado por subunidades de 27 KDa con la estructura de barril α/β . Cada barril consta de 8 unidades asa-hebra β -asa- α hélice. Las subunidades se

asocian a través de interacciones no-covalentes. Cada monómero contiene un sitio activo completo localizado cerca de la interfase que comparten las dos subunidades. Los residuos que forman las asas son muy importantes para la estabilidad del dímero y para la catálisis. Las asas 3 y 6 son largas y resaltan en la estructura. El asa 3 o asa de la interfase “encaja” en una cavidad que se encuentra cerca del sitio activo de la otra subunidad. Cuando se comparan las estructuras cristalográficas de la TIM con ligando y sin ligando, se observa que el asa 6, también llamada asa catalítica, se mueve de una conformación conocida como cerrada, a una conformación abierta. La posición de la punta de esta asa, difiere en 7 Å entre ambas conformaciones (Wierenga & Noble, 1992).

Mutaciones puntuales en la TIM de *Sacharomyces cerevisiae* (yTIM), indican que aquellos cambios que desestabilizan la conformación cerrada de la enzima, también alteran significativamente las propiedades catalíticas de ésta (Sampson & Knowles, 1992; Sun & Sampson, 1998). Los resultados obtenidos por la eliminación de 4 residuos contiguos del asa 6 que interaccionan directamente con el sustrato en la yTIM, indican que el sustrato se une muy débilmente a la enzima perdiendo al enediol con una gran facilidad. Se cree que esta asa evolucionó para unir fuertemente al intermediario enediol, que es altamente reactivo (Pompliano *et al.*, 1992).

Originalmente se pensó que la presencia del ligando provocaba el cambio de conformación del asa a la forma cerrada (Joseph, *et al.*, 1990; Wierenga *et al.*, 1991a; Noble *et al.*, 1993a). Estudios posteriores con la mutante W90Y/W157F de yTIM, cuyo W 168 (localizado en el asa catalítica) se marcó en el grupo indol para obtener espectros de RMN, indican que el asa 6 pasa de la conformación abierta a cerrada a una velocidad de $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. La comparación de los espectros y las velocidades entre la enzima con sustrato y

sin sustrato indican que la presencia del sustrato no induce el movimiento, sino que el asa 6 tiene un movimiento independiente de la presencia de sustrato (Williams & Dermott, 1995).

La TIM sólo es activa como dímero; los monómeros no presentan actividad catalítica, aunque presentan los residuos necesarios para llevar a cabo la catálisis. En el dímero, dichos monómeros funcionan independientemente y no se ha observado cooperatividad entre las dos subunidades. Se ha sugerido que la presencia de la otra subunidad es necesaria para estabilizar la geometría de los residuos del sitio activo (Wierenga & Noble, 1992).

Con excepción de las TIMs de las arqueos hipertermófilas *Pyrococcus woesei* y *Methanothermus fervidus*, que son homotetrámeros (Kohlhoff *et al.*, 1996), todas las TIMs silvestres que se conocen son dímeros, incluyendo la enzima bifuncional fosfoglicerato cinasa/triosafosfato isomerasa de la hipertermófila *Thermotoga maritima* en la que ambas enzimas están unidas covalentemente (Schurig *et al.*, 1995; Beaucamp *et al.*, 1997).

Se han realizado gran cantidad de sustituciones de residuos de la TIM de diferentes especies por mutagénesis dirigida. Mientras algunos de ellos han tenido como objetivo principal el conocer el papel de un residuo específico en la catálisis (Lodi *et al.*, 1994; Joseph-McCarthy *et al.*, 1994), otros tienen el objetivo de estabilizar o desestabilizar a la proteína por introducción o sustitución de residuos. Ejemplo de estos últimos es la estabilización de la TIM de *Leishmania mexicana* (Kohl *et al.*, 1994), una enzima mesófila cuya mutante E65Q es una enzima superestable que tolera hasta 26 °C más de la temperatura tolerada por la proteína silvestre (Williams *et al.*, 1999). También se han obtenido mutantes monoméricas de la TIM de humano tratando de desestabilizar a la forma dímica y estabilizar la forma monomérica (Mainfroid *et al.*, 1996a; 1996b.)

La obtención de mutantes de la TIM de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) se ha realizado bajo este principio, en el que la sustitución de uno o varios residuos en la interfase entre los

monómeros permite obtener TIMs monoméricas. Las mutantes monoméricas construidas hasta la fecha son las siguientes:

- La mutante H47N no permite la formación de un puente de hidrógeno mediado por agua, que provoca que la mutante tenga un comportamiento de dímero a altas concentraciones de proteína (por arriba de 3 mg mL^{-1}) y como monómero a bajas concentraciones (Borchert *et al.*, 1993; Borchert *et al.*, 1995).
- Recientemente, la sustitución de la C14 por F en la TbTIM (C14F), ha sido caracterizada como un monómero (Hernández-Alcántara *et al.*, 2002).
- La mono TIM, en la que un fragmento de la región de la interfase de la TbTIM (IAKSGAFTGEVSLPI) se sustituyó por un secuencia hidrofílica y más corta (GNADALAS) (Borchert *et al.*, 1994, Schliebs *et al.*, 1996).
- Sobre esta mutante monomérica se construyó la RMMO-ITIM por evolución dirigida sobre el gen de la monoTIM y por selección de mutantes activas (Saab-Rincón *et al.*, 2001).
- La RE-TIM en la que la T75 y la G76 (en el asa 3) se sustituyeron por R y E respectivamente, obteniendo una TIM monomérica en solución con actividad residual. A esta mutante se le ha considerado lo más parecido a un “monómero silvestre” (Schliebs *et al.*, 1997).

Actualmente se conoce la secuencia de más de 62 especies de la TIM, y se tiene disponible la información estructural de la TIM de diferentes especies que incluyen *Gallus gallus* (Banner *et al.*, 1975), *Saccharomyces cerevisiae* (Lolis *et al.*, 1990), *Trypanosoma brucei* (Wierenga *et al.*, 1991a), *E. coli* (Noble *et al.*, 1993b), *Homo sapiens* (Mande *et al.*, 1994), *Bacillus stearothermophilus* (Delboni *et al.*, 1995), *Plasmodium falciparum*

(Velanker *et al.*, 1997), *Vibrio marinus* (Alvarez *et al.*, 1998), *Trypanosoma cruzi* (Maldonado *et al.*, 1998), *Leishmania mexicana* (Williams *et al.*, 1999), *Pyrococcus woesei* (Walden *et al.*, 2001) y *Entamoeba histolytica* (Rodríguez-Romero *et al.*, enviado).

1.12 Estudios de desnaturalización de la TIM

Varios estudios de desnaturalización han dado origen a datos tanto cinéticos como al equilibrio del patrón de desnaturalización y/o renaturalización de TIMs homólogas. En el caso de la TIM de pollo, su cinética de desnaturalización muestra un proceso de dos estados. En estos experimentos se observa una sola transición, por lo que en la desnaturalización por GdnHCl, la TIM aparentemente se despliega y disocia simultáneamente (Mc Vittie *et al.*, 1977).

Los resultados cinéticos de la renaturalización de la TIM de conejo muestran la presencia de un intermediario (Waley, 1973., Zabori *et al.*, 1980). Usando GdnHCl como desnaturalizante, los experimentos al equilibrio con esta misma enzima muestran un proceso de dos estados, mientras que los resultados cinéticos permitieron obtener información sobre las características de un intermediario (Rietveld & Ferreira, 1998).

Para la TIM de humano se calculó la estabilidad conformacional del dímero y de mutantes monoméricas de la misma, ajustando los datos de desnaturalización al equilibrio por urea a un modelo de dos estados (Mainfroid *et al.*, 1996a).

La desnaturalización inducida por urea de la TIM de *Plasmodium falciparum* muestra un comportamiento de dos estados, sin embargo cuando la desnaturalización se induce con GdnHCl, se observa un intermediario que se caracterizó como un agregado (Gokhale *et al.*, 1999).

Los estudios de desnaturalización con la TIM de *Saccharomyces cerevisiae* (yTIM) muestran un proceso de dos estados con urea. Sin embargo, para describir el proceso de desnaturalización con GdnHCl es necesario utilizar un modelo de tres estados. En este caso, se propuso que el estado intermediario en el plegamiento de la yTIM es un monómero (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000., Morgan *et al.*, 2000). Recientemente se ha propuesto que el replegamiento y la dimerización por desnaturalización térmica de la yTIM son eventos acoplados donde no se observa la presencia de intermediarios (Benítez-Cardoza *et al.*, 2001).

Diferentes técnicas espectroscópicas se han utilizado para caracterizar TIMs homólogas. La fluorescencia intrínseca se ha usado para seguir la exposición de residuos aromáticos durante la disociación y desplegamiento por urea (Manfroid *et al.*, 1996a, Manfroid *et al.*, 1996b, Gokhale *et al.*, 1999, Vázquez-Contreras *et al.*, 2000) o por GdnHCl (Rietveld & Ferreira., 1998, Gokhale *et al.*, 1999, Vázquez-Contreras *et al.*, 2000, Morgan *et al.*, 2000 y Lambeir *et al.*, 2000). Todas las TIMs utilizadas en estos trabajos tienen varios residuos W en su secuencia. Como mencionamos anteriormente, estos residuos se pueden usar para seguir cambios conformacionales en la proteína. Sin embargo, la presencia de más de un W en la secuencia limita la interpretación de los datos de fluorescencia. La estrategia propuesta en estos casos, es sustituir los residuos W por un aminoácido que conserve el carácter hidrofóbico de la cadena pero que contribuya mucho menos al espectro de emisión de fluorescencia como Y o F (Royer *et al.*, 1993, Eftink, 1994).

La TbTIM tiene 5 triptofanos en las posiciones 12, 90, 159, 170 y 193. El W12 se encuentra localizado en el asa 1, el W90 en la hebra β 4, el W159 en una hélice 3_{10} antes de

la hebra β 6. En el asa 6 o asa catalítica se encuentra el W170 y el W193 se localiza en la α hélice 6 (Figura 2).

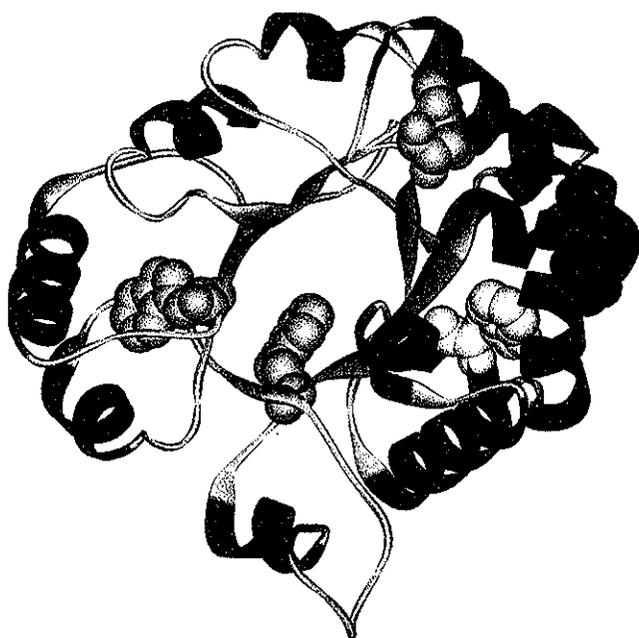
En este trabajo se construyeron las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F (en las cuales los residuos 12, 12 y 193, y 159 se sustituyeron por fenilalanina respectivamente) para determinar la contribución a la fluorescencia de estos residuos y caracterizar el patrón de desplegamiento de las mutantes y la proteína silvestre en urea y GdnHCl. La mutante W12F/W193F tiene los mismos residuos W que la γ TIM, por lo que nos permite una comparación directa del patrón de desnaturalización observado por fluorescencia intrínseca con esta última enzima. Los datos de fluorescencia obtenidos con la proteína silvestre y las mutantes nos permitieron proponer qué regiones se exponen durante el patrón de desnaturalización por ambos desnaturalizantes.

Las enzimas se caracterizaron en términos de su estabilidad a la dilución, reversibilidad y parámetros catalíticos y de fluorescencia. Se obtuvieron los patrones de desnaturalización por DC, actividad catalítica y unión de 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) adicionalmente a la fluorescencia intrínseca.

En el caso de GdnHCl, la TbTIM se caracterizó por cromatografía de exclusión molecular (CEM) y se propuso un modelo que explica el complejo proceso de desnaturalización por GdnHCl que involucra la presencia de un intermediario monomérico y uno dimérico, así como agregados que explican la irreversibilidad del proceso.

Página siguiente

Figura 2. Diagrama de un monómero de la TbTIM silvestre. Se muestra la posición de los 5 residuos W. Los W 12, 90 y 170 se localizan en el asa 1, hebra β 4, y en el asa catalítica (asa 6), respectivamente y en la figura se muestran en gris. El W193 se encuentra en la α hélice 6 y se muestra en negro. Este residuo se encuentra expuesto al solvente y apaga la fluorescencia del W159 que se encuentra en la hélice 3₁₀, antes de la hebra β 6. El W159 se muestra en gris claro. Las coordenadas se obtuvieron del archivo 5TIM del PDB (Wierenga et al., 1991b).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar el desplegamiento inducido por urea y GdnHCl de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM).

Objetivos particulares

Construir, sobreexpresar, purificar y caracterizar mutantes de la TbTIM con residuos W sustituidos.

Caracterizar a la TbTIM y sus mutantes con W sustituidos en términos de estabilidad a la dilución y el grado de reversibilidad del proceso de desplegamiento inducido por urea y GdnHCl.

Obtener el patrón de desplegamiento de la TbTIM y sus mutantes por fluorescencia, actividad catalítica y dicroísmo circular al desnaturalizar con urea y GdnHCl.

Obtener un esquema posible sobre la exposición de regiones de la TbTIM a lo largo del desplegamiento de la enzima con urea y GdnHCl utilizando a las mutantes con residuos W sustituidos.

Identificar la existencia de intermediarios y determinar su estado de asociación en el desplegamiento de la TbTIM por CEM-FPLC.

Proponer un modelo que describa el proceso de desplegamiento de la TbTM por urea y/o GdnHCl.

2. Material y Métodos

Gen de TbTIM

El gen de la TbTIM (Swinkels *et al.*, 1986) fue donado por el Dr. P.A.M. Michaels (Research Unit for Tropical Diseases, ICP-TROP, Brussels, Belgium)

2.1 Construcción de las mutantes

La sustitución de los residuos W por F en las posiciones 12, 159 y 193 se llevó a cabo por mutagénesis dirigida utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el "Expand High Fidelity PCR System" (Boehringer). Los oligonucleótidos utilizados fueron: (directo y complementario respectivamente para cada mutante):

W12F 5'-ATCGCAGCAGCCAACCTTCAAGTG CAACGGC-3' y

5'-GCCGTTGCACTTGAAGTTGGCTGCTGCGAT -3'.

W159F 5'-CTGAAGAAGGCTGACTTCG CCAAAGTTGTCATC-3' y

5'-GATGACAACTTTGGCGAAGTCAGCCTTCTTCAG -3'.

W193F 5'-GCACTCATCCGCAGCTTCGTGAGCAGCAAGATT-3' y

5'- AATCTTGCTGCTCACGAAGCTGCGGATGAGTGC-3'.

Para cada una de las mutantes se realizó la primera reacción de PCR con 200 ng de los oligonucleótidos mutagénico directo y T7 terminador (Novagen pET System) y la mezcla de reacción para PCR del Expand High Fidelity PCR System (Boehringer) a una concentración de MgCl₂ de 1.5 mM.

Se utilizó un amplificador de PCR (Gene Amp PCR system 2400, Perkin Elmer) a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55 °C y 1 min a 72 °C y por último 10 minutos a 72°C.

Las mismas condiciones de tiempo y temperatura se utilizaron en una segunda reacción de PCR con 200 ng del oligonucleótido mutagénico complementario correspondiente y el T7 promotor.

El DNA amplificado de cada una de estas reacciones se corrió en un gel de agarosa al 1 %. El DNA (primera reacción) de 1015 pb, 573 pb y 471 pb para las mutantes W12F, W159F y W193F respectivamente y de 114 pb, 552 pb y 654 pb para la segunda reacción de PCR se aislaron usando el *gene clean system* (Bio 101).

Con el DNA aislado resultado de ambos PCRs para cada mutante se realizó la amplificación final del gen completo (0.75 Kb más 0.350 Kb de secuencia de plásmido, 1.1 Kb) en una tercera reacción de PCR.

La tercera reacción de PCR se realizó como sigue:

W12F: fragmento 1015 pb (primer PCR), fragmento 114 pb (segundo PCR), T7 promotor, T7 terminador y mezcla de reacción de Expand High Fidelity PCR System (Boehringer).

W159F: fragmento 573 pb (primer PCR), fragmento 552 pb (segundo PCR), T7 promotor, T7 terminador y mezcla de reacción.

W193F: fragmento 471 pb (primer PCR), fragmento 654 pb (segundo PCR), T7 promotor, T7 terminador y mezcla de reacción.

Los productos de PCR se clonaron en el vector pET3a en los sitios XbaI y Bam HI, y con ellos se transformó la cepa BL21(DE3)pLysS cells (Novagen). Los genes completos se secuenciaron para confirmar la mutación y verificar que no hubiera errores.

2.1.1 Construcción de la doble mutante W12F/W193F

Los plásmidos pET3a-W12F y pET3a-W193F se digirieron con las enzimas de restricción KpnI y BamHI. La digestión de estos plásmidos dio como resultado dos

fragmentos de 5161 y 490 pb. Los fragmentos de 5161pb de W12F y de 490 pb de W193F se purificaron utilizando el *gene clean system* (Bio 101). Estos dos fragmentos se ligaron y se usaron para transformar las células BL21(DE3) pLysS. La secuenciación completa de esta construcción confirmó la mutación de los residuos W12 y W193 por F en el gen de la TbTIM.

2.1.2 RMMO-1TIM

La RMMO-1TIM (Saab-Rincón *et al.*, 2001) es una mutante monomérica donada por la Dra. Gloria Saab-Rincón del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta mutante monomérica se obtuvo por medio de un esquema de evolución dirigida sobre el gen de la MonoTIM de Wierenga (Borchert *et al.*, 1994). La RMMO1-TIM se obtuvo por mutagénesis al azar del gen de la monoTIM y la posterior selección de mutantes activas. La mutante RMMO1-TIM tiene las mutaciones adicionales S43P, T44A, A179T, se comporta como monómero y tiene una k_{cat} un orden de magnitud mayor que la monoTIM (Saab-Rincón *et al.*, 2001).

2.2 Sobreexpresión y purificación de la TbTIM recombinante y las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F

El mismo protocolo de sobreexpresión y purificación de la TbTIM se usó para las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F, y se describe aquí para 1 L de cultivo que rinde entre 15 y 25 mg totales de TIM pura.

2.2.1 Sobreexpresión

100 mL de medio Luria-Bertani (LB) complementado con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina y $34 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloramfenicol se inocularon con una colonia fresca de BL21(DE3)pLysS pET3a-TbTIM. Este cultivo se creció durante toda la noche a 37°C con agitación constante (2500 rpm) y se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm. Con el botón resuspendido se inoculó un litro de medio LB conteniendo la misma concentración de ambos antibióticos. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica $A_{600} = 0.8-1.0$, se agregó el inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM con agitación constante (2500 rpm) a 37°C durante toda la noche.

2.2.2 Purificación de la TbTIM

La purificación de la TbTIM se realizó con base en el protocolo descrito por Borchert y col. (Borchert *et al.*, 1993) y se describe aquí con algunas modificaciones para 1 L de medio LB con la cepa inducida y sobreexpresada. Se centrifugó 1 L de cultivo durante 10 minutos a $4260 \times g$ a 4°C . El botón se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (MES 25 mM, DTT 1mM, EDTA 1mM y PMSF 0.2 mM pH 6.5). Las células se rompieron por cambio de presión en una French Press a 1500 *psi*, y 4°C . Los pasos siguientes se realizaron también a 4°C . El lisado se centrifugó a $17000 \times g$ durante 15 minutos. El botón se resuspendió en 20 mL de amortiguador de lisis con 200 mM NaCl con agitación constante, de 30 min a 1 hora y se centrifugó a $17000 \times g$ durante 15 minutos. El sobrenadante se precipitó de 12 a 24 hrs con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45% de saturación. Se centrifugó a $17000 \times g$ durante 15 minutos. El sobrenadante se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 65 % de saturación de 12 a 24 hrs y posteriormente se centrifugó a $17000 \times g$ por 15 minutos.

El botón obtenido por la precipitación con 45-65 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se disolvió en 2 mL de amortiguador A (Trietanolamina (TEA) 100 mM, NaCl 25 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y NaN_3 1mM pH 8) y se dializó contra el mismo amortiguador con dos cambios de 0.6 y 1L. La muestra se pasó por una columna de carboximetil (CM) sefarosa en un sistema de FPLC (fast pressure liquid chromatography) (Pharmacia LKB, Uppsala Sweden). La columna se equilibró con el amortiguador A y se eluyó con un gradiente de 25-100 mM de NaCl. La proteína se cuantificó por absorbencia a 280 nm (UV 280 nm) y actividad catalítica. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE al 12.5 % o 15% de acrilamida teñido con azul de Coomasie o plata.

2.3 Caracterización de la TbTIM y de las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F

La concentración de proteína se determinó con el método del ácido bicinónico BCA Protein Assay (Pierce) y se confirmó con mediciones de absorbencia a 280 nm utilizando coeficientes de absorción molar calculados de acuerdo a Pace y col. (Pace *et al.*, 1995). Estos fueron $\epsilon(280) (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) = 1.308$ para la TbTIM, 0.896 para W12F/W193F y 1.102 para W12F y W159F.

La actividad catalítica de la TIM, en el sentido del gliceraldehído 3-fosfato se calculó por el cambio en absorbencia a 340 nm, resultado de la oxidación /reducción del NADH/NAD⁺ en un ensayo acoplado con la enzima α -glicerol-fosfato deshidrogenasa a 25 °C. Se midió en un espectrofotómetro (Beckman DU 7500 spectrophotometer) con temperatura controlada a 25 °C. Se siguió el protocolo descrito por Borchert y col. (Borchert *et al.*, 1993), usando las siguientes condiciones: TEA 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 1 mM (TED 100/10/1) pH 7.4, gliceraldehído-3-fosfato 0.025-2.5 mM, α -glicerol-fosfato deshidrogenasa 5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y NADH 0.2 mM .

2.3.1 Ensayos de estabilidad a la dilución de la TbTIM y W12F/W193F

La TbTIM y W12F/W193F se incubaron en un intervalo de concentraciones de proteína que varió entre $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.0625 \mu\text{g mL}^{-1}$ en amortiguador TED 100/10/1 pH 7.4 a 25 °C. La actividad catalítica se determinó con 5 ng TIM mL^{-1} a las 0, 24 y 200 hrs de incubación.

2.3.2 Obtención de los espectros de fluorescencia y dicroísmo circular (DC) para la TbTIM, W12F, W159F y W12F/W193F

La TbTIM y las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F se incubaron a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en amortiguador TED 20 /1/1 pH 7.4. Los espectros de emisión de fluorescencia entre 310-400 nm (slit= 0.5 nm), (excitación 295 nm, slit= 1nm) se obtuvieron en un fluorómetro (ISS PCI Photon Counting Spectrofluorometer ISS, Urbana, IL). Para los espectros de dicroísmo circular, la concentración de proteína usada fue de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4 y se filtraron en una membrana de $0.45 \mu\text{m}$. Los espectros se obtuvieron a 25 °C en un espectropolarímetro AVIV 62 HDS con una celda de 0.1 cm en un intervalo de 190-240 nm y un ancho de banda de 1 nm. Se realizaron 5 repeticiones por espectro. Para calcular los valores de elipticidad molar se determinó la concentración de proteína por BCA de las muestras filtradas.

2.4 Experimentos de desnaturalización inducidos por urea e hidrocloreuro de guanidina y analizados por fluorescencia y dicroísmo circular

Los experimentos de desnaturalización se realizaron con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TIM a 25 °C en TED 20/1/1 pH 7.4 a concentraciones crecientes de GdnHCl entre 0 y 6.0 M, y entre 0 y 9.0 M de urea. Experimentalmente se observó por IF y actividad, que a las 48 horas de

incubación con GdnHCl y a las 200 horas de incubación con urea, las señales muestran una variación mínima. A lo largo de este trabajo nos referiremos a estos tiempos como tiempo de incubación.

Los cambios en la intensidad de fluorescencia a 322 nm (excitación 295 nm) se siguieron en el espectrofluorómetro ISS. El centro de masa espectral (SCM) de cada espectro de fluorescencia se determinó con el programa de ISS que utiliza la siguiente ecuación:

$$SCM = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)} \quad (1)$$

Donde $I(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda λ .

Por otra parte, los cambios en elipticidad se siguieron a 222 nm con un espectropolarímetro AVIV 62 HDS con una celda de 0.1 cm, termorregulada a 25 °C. En ambos casos, se restaron muestras de referencia con la correspondiente concentración de desnaturalizante.

2.5 Unión de ANS

Se añadió ANS 100 μ M a cada una de las muestras con las diferentes concentraciones de desnaturalizante bajo las mismas condiciones del apartado anterior. El seguimiento de la unión y fluorescencia del ANS se hizo en el espectrofluorómetro ISS. La longitud de onda de excitación fue 360 nm y la longitud de onda de emisión se registró en un intervalo de 400-560 nm. A todos los espectros obtenidos se les restó un espectro de referencia obtenido con soluciones sin proteína.

2.6 Actividad catalítica de las muestras incubadas en urea e hidrocloreuro de guanidina

Las muestras utilizadas para medir fluorescencia y DC se emplearon para medir actividad catalítica. Como se mencionó anteriormente, el ensayo para determinar la actividad catalítica de la TIM es un ensayo acoplado a la reacción de la enzima α -glicerol-fosfato deshidrogenasa, por lo que es necesario evitar el efecto del desnaturizante sobre esta última enzima diluyendo las muestras. Esta dilución se debe hacer también debido a que la determinación de la actividad catalítica se realiza con una concentración de TIM de 5 ng mL⁻¹ (es decir, una concentración diez mil veces menor que la usada en los experimentos de desnaturización).

El protocolo para medir la actividad catalítica de las muestras incubadas a las diferentes concentraciones de desnaturizante es el siguiente (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000): Las muestras de TIM (50 μ g mL⁻¹), se incubaron en TED 20/1/1 pH 7.4 por el tiempo de incubación correspondiente a urea o GdnHCl en sus diferentes concentraciones.

En un primer paso, las muestras se diluyeron a 5 μ g mL⁻¹ de TIM manteniendo la concentración de desnaturizante utilizado en la incubación. En un segundo paso, las muestras se transfirieron al medio para medir actividad catalítica (Borchert *et al.*, 1993), de tal manera que la actividad se midió con 5 ng mL⁻¹ de TIM y una concentración residual de GdnHCl o urea de menos de 6 o 10 mM, respectivamente.

La dilución podría modificar el equilibrio entre el dímero nativo, los intermediarios y la forma desplegada de la TIM. Para dilucidar el efecto del primer paso del proceso sobre la fracción de las moléculas activas, se modificó el tiempo de incubación entre 10 segundos y 1 minuto, así como la concentración de la TbTIM de 1 a 10 μ g mL⁻¹ y no hubo ningún

efecto. Para el segundo paso, se sabe que el tiempo para la reasociación de la TbTIM es del orden de horas a las concentraciones de la enzima usadas para los ensayos catalíticos (Zabori *et al.*, 1980; Gao *et al.*, 1998). Si hay reasociación, ésta debe verse como una curvatura hacia abajo en las lecturas de los ensayos de actividad, mientras que la disociación se observaría como una curvatura hacia arriba. Sin embargo, las lecturas de la reacción son lineales, indicando que no ocurre ni reasociación ni disociación de la proteína durante el tiempo en que se lleva a cabo el ensayo. Esto nos permite suponer que el equilibrio entre las moléculas activas e inactivas, no se modifica durante el ensayo de actividad.

2.7 Ensayos de reversibilidad de la TbTIM

La desnaturalización de la TbTIM (2.0-5.0 mg mL⁻¹) en TED 20/1/1 pH 7.4 durante el tiempo de incubación a 25 °C, se llevó a cabo en concentraciones crecientes de urea (0 a 9.0 M) y de GdnHCl (0 a 6.0 M). Las muestras se diluyeron en TED 20/1/1 pH 7.4 a 50, 5 y 2 µg TIM mL⁻¹ y 80 mM de urea o 60 mM de GdnHCl residual durante 24 hrs a 25 °C. La intensidad de fluorescencia a 320 nm (excitación 280 nm) y la actividad catalítica de las muestras renaturalizadas se determinó como se describió anteriormente.

2.8 Cromatografía de exclusión molecular y determinación del radio de Stokes para la desnaturalización con GdnHCl

Para los experimentos de cromatografía de exclusión molecular se utilizó una columna Superdex 75 (Amersham Pharmacia) y un equipo de FPLC (Pharmacia, Uppsala Sweden) con un detector de absorbencia UV con longitud de onda fija a 280 nm y un detector de fluorescencia (Waters) utilizando 320 nm como longitud de onda de máxima emisión y 280 nm para la excitación. La columna Superdex 75 es estable en presencia de desnaturalizantes

como urea y GdnHCl mientras se mantenga un pH de entre 3 y 12. El rango óptimo de separación de proteínas globulares es de 3000 a 70 000 (Da) y su límite de exclusión es de 100 000 (Da) (Amersham Pharmacia Biotech). El radio de Stokes se determinó por el análisis del volumen de elución, con respecto a una curva de calibración que se realizó de acuerdo a Uversky (1993).

2.8.1 Calibración de la columna

En la construcción de la curva de calibración se utilizaron proteínas de masa molecular y radio de Stokes conocidos, tanto en condiciones nativas como en condiciones desnaturalizantes (6.0 M de GdnHCl y 8.0 M de urea) (Uversky, 1993): transferrina, albúmina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, quimotripsinógeno, mioglobina, ribonucleasa, lisozima, citocromo c e insulina. Estas proteínas se incubaron a una concentración de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en amortiguador TED 100/10/1 pH 7.4 para las proteínas nativas y GdnHCl 6.0 M en TED 100/10/1 pH 7.4 para las condiciones desnaturalizantes.

Las muestras se pasaron por la columna previamente equilibrada en el mismo amortiguador TED 100/10/1 pH 7.4 o con GdnHCl 6.0 M a un flujo de 0.4 mL min^{-1} .

La detección por fluorescencia es más sensible que la de absorción UV por lo que en lo subsecuente utilizamos la curva obtenida por intensidad de fluorescencia, aclarando que no hay variación alguna entre estas dos señales.

Los datos obtenidos (ver sección de resultados) indican que las características de la columna no dependen de la presencia del desnaturalizante, por lo que es posible utilizar una sola curva que incluya la dependencia de la velocidad de migración ($1000/V_{el}$) vs. el radio de Stokes y que es descrita por:

$$1000/V_{el} = (1.4934)R_s + 48.1495 \quad (2)$$

La curva obtenida tiene un coeficiente de correlación (r) de 0.9734 para 30 puntos experimentales. La determinación del radio de Stokes con la columna Superdex 75 tiene una buena correlación con lo reportado en la literatura, por lo que puede ser usada para determinar las dimensiones de las proteínas en su estado nativo y desnaturalizado.

2.8.2 Muestras experimentales: TbTIM y RMOO-TIM

100 μ L de TbTIM o RMMO-TIM (Saab-Rincón *et al.*, 2001) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) incubadas durante 48 horas a diferentes concentraciones de GdnHCl se inyectaron a la columna Superdex 75 previamente equilibrada a la misma concentración de GdnHCl. La RMMO-TIM utilizada en este trabajo nos fue donada por la Dra. Gloria Saab del Instituto de Biotecnología, UNAM.

2.9 Superficie de exposición al solvente y distancias entre los residuos triptofano en la TbTIM.

El área accesible al solvente de las cadenas laterales de los residuos W se calculó con el programa NACCESS (Simon Hubbard, University College, U.K.) (Lee & Richards, 1971) usando un radio de prueba de 1.4 Å y un ancho de corte de 0.1 Å. Los valores de exposición al solvente se expresan como el porcentaje de área accesible de la cadena lateral de un tripéptido AWA en su conformación extendida. Para todos los cálculos se utilizó el archivo 5TIM del Protein Data Bank (PDB) (Wierenga *et al.*, 1991b).

2.10 Estimación de estructura secundaria

El análisis del contenido de α hélice en los espectros de DC se realizó usando los programas CDNN (Bohm *et al.*, 1992) y CDSstr (Johnson, 1999).

2.11 Cálculo de los valores de $C_{1/2}$ para los patrones de desnaturalización con GdnHCl.

Los valores de $C_{1/2}$ se calcularon con el programa Savuka ver. 5.1 (Bilsel *et al.*, 1998), dividiendo el valor de ΔG de cada transición entre el factor cooperativo (A). Debido a que se observan dos transiciones por CD e IF, los valores de $C_{1/2}$ se calcularon asumiendo un modelo de tres estados y para actividad catalítica se ajustó a un modelo de dos estados.

3. RESULTADOS

3.1 Sobreexpresión de la TbTIM y las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F

La TbTIM y las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F se encuentran clonadas en el plásmido pET3a y en la cepa BL21(DE3) pLysS. Para inducir la expresión del gen de la TIM en cualquiera de los casos se agregó una concentración final de 0.4 mM de IPTG, que induce la transcripción de la T7 RNA polimerasa. El gen a expresar está bajo el control del promotor T7 del plásmido pET3a. La T7 RNA polimerasa se une a este promotor e inicia la transcripción del gen. La cepa BL21(DE3)pLysS posee el plásmido pLysS, que confiere resistencia a cloramfenicol y que permite que se produzcan pequeñas cantidades de lisozima. La producción de lisozima por parte de la cepa, permite que la pared celular sea digerida por ésta y sea mucho más sencillo romper a las células.

Se probaron diferentes temperaturas de inducción, 15, 21, 28 y 37 °C para la sobreexpresión de las mutantes. Las temperaturas de 28 y 37 °C fueron las que originaron el mejor nivel de expresión. La expresión de las mutantes se realizó posteriormente a 37 °C.

3.2 Purificación de TbTIM y de las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F

La purificación de la TbTIM se hizo de acuerdo al protocolo de Borchert y col. (Borchert *et al.*, 1993) (ver material y métodos), con una columna de CM. Como la expresión de la TIM se realiza en un sistema bacteriano, existe la posibilidad de que haya contaminación de la TIM de *E. coli*. El protocolo descrito en material y métodos presenta dos pasos en los que se asegura que la TIM de *E. coli* no contamine la muestra. El punto isoeléctrico (pI) de la TbTIM es 9.85 mientras que el pI de la TIM de *E. coli* es de 5.86. El amortiguador de lisis de la purificación tiene un pH de 6.5, en estas condiciones, la TbTIM tiene carga positiva

mientras que la TIM de *E. coli* tiene carga negativa. La primera centrifugación precipita membrana celular a la cual se une la TbTIM, mientras que la de *E. coli* se queda en el sobrenadante. La TbTIM se recupera al resuspender el botón aumentando la fuerza iónica con 200 mM NaCl. El mismo criterio de separación opera en la columna de CM, la cual se corre en el amortiguador A, pH 8 (ver material y métodos).

En todas las purificaciones que se realizaron en este trabajo, se cargaron aproximadamente 60 mg proteína total a la columna, obteniendo entre 35 y 45 mg de TIM pura a partir de entre 15-18 g de células (3 L de cultivo). La purificación de las mutantes W12F y W12F/W193F se realizó siguiendo el mismo protocolo de purificación de la proteína silvestre. En resumen, se obtuvieron entre 20 y 25 mg totales de proteína por 15 g de células (3 L de cultivo).

Para la mutante W159F se siguió también el protocolo de purificación de la proteína silvestre. La única modificación fue que la proteína antes de ser pasada por la columna de CM ya estaba pura. Sin embargo se pasó por la columna para asegurar que no existiera contaminación de la TIM de *E. coli*. En este caso particular, se obtuvieron 164 mg mL^{-1} para 18 g de células.

Tanto para la purificación de la TbTIM como de las mutantes, el análisis densitométrico del gel (SDS-PAGE) mostró que la banda correspondiente a la TbTIM representa entre el 98 y 99% de la proteína total.

3.3 Propiedades catalíticas de la TbTIM y de las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F

La TbTIM así como las tres mutantes de la TIM de tripanosoma, se purificaron a homogeneidad y se determinaron sus parámetros catalíticos. Los resultados se pueden

observar en la Tabla I. Los parámetros catalíticos de las enzimas estudiadas son similares por lo que podemos sugerir que en su estado nativo el sitio catalítico de las mutantes conserva sus propiedades. La figura 2 muestra la posición de los W en la TbTIM.

Tabla I. Propiedades catalíticas y de fluorescencia de la TbTIM y las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F. Los parámetros catalíticos se determinaron como se describió en material y métodos. En el caso de los parámetros de fluorescencia, los espectros de emisión se determinaron excitando a 295 nm y tomando un rango de emisión de 310-400 nm. SCM (centro de masa espectral).

Enzima	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	Posición de los W restantes	λ_{max} (nm)	S.C.M.
TbTIM	0.20	0.87×10^5	12,90,159,170,193	322	336.7
W12F	0.34	0.76×10^5	90,159,170,193	322	336.8
W12F/W193F	0.65	1.12×10^5	90,159,170	322	337.3
W159F	0.28	1.07×10^5	12,90,170,193	322	336.7

3.4 Propiedades espectroscópicas de la TbTIM y de las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F

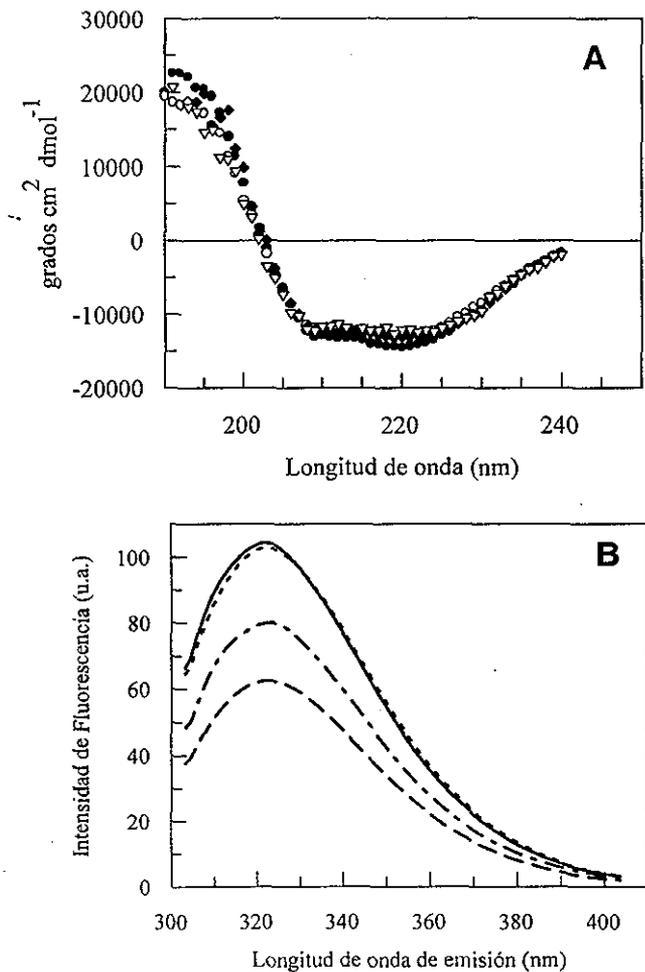
Dicroísmo circular

Los espectros de DC para la TbTIM y las mutantes (Figura 3A) son muy similares, indicando que no hay cambios considerables en la estructura secundaria de las cuatro mutantes en su estado nativo respecto a la proteína silvestre. Los espectros se analizaron con los programas CDNN (Bohm *et al.*, 1992) y CDsstr (Johnson, 1999). Ambos métodos indicaron que el porcentaje de α hélice y β plegada de la TbTIM silvestre y las tres mutantes es prácticamente el mismo.

Fluorescencia intrínseca

El espectro de fluorescencia intrínseca de las cuatro proteínas indica que las enzimas poseen el mismo valor de λ_{\max} (322 nm) y del centro de masa espectral (SCM) (Tabla 1). Las mutantes construidas en este trabajo son sustituciones de W por F, por lo que en ausencia de efectos de apagamiento de la fluorescencia se espera una disminución de la eficiencia cuántica en todas las mutantes. En el espectro de la mutante W12F, hay una disminución de un 40 % en la intensidad de fluorescencia en la λ_{\max} al compararla con la TbTIM (Fig. 3B). La sustitución de un segundo W en W12F/W193F muestra sólo una disminución del 20 % en la intensidad de fluorescencia comparada con la TbTIM, es decir, la eficiencia cuántica de W12F/W193F es mayor que la de W12F (Fig. 3B). Este resultado sugiere que el W193, se encuentra apagando la fluorescencia de otro triptofano. Para que esto sea posible, es necesario que el W193 sea un residuo expuesto al solvente, de tal

manera que pierda la fluorescencia al medio. Por otro lado se requiere que el W193 se encuentre cercano a otro W.



3. Espectros de diroísmo circular e intensidad de fluorescencia. Los espectros de DC (A) e IF (B) de la TbTIM silvestre, W12F, W12F/W193F y W159F en condiciones nativas. (A) Espectro d DC de TbTIM (•), W12F (o), W12F/W193F (∇) y W159F (♦) en 10 mM de amortiguador de fosfatos pH 7.4. (B) Espectro de emisión de fluorescencia para W12F (— — —), W159F (- - -), W12F/W193F (- - - - -) y TbTIM (————). Los espectros de fluorescencia se obtuvieron a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TIM en TED 20/1/1 pH 7.4 (longitud de onda de excitación=295 nm).

El análisis del porcentaje de área de exposición al solvente fue calculado con el programa NACCESS (Lee & Richards, 1971), los resultados se muestran en la tabla II. De los cinco residuos W de la TbTIM, el W193 es el más expuesto, (18.6 %).

El apagamiento de la fluorescencia depende en gran medida de la distancia entre Ws, por lo tanto, se realizó un análisis de la distancia entre el W193 y los otros cuatro Ws.

En la tabla III se observa que el W159 es el W más cercano a W193. En la Figura 3B podemos observar que la mutante W159F tiene esencialmente el mismo espectro de emisión de fluorescencia de TbTIM. Esto sugiere claramente que en el estado nativo, el W159 no contribuye al espectro de fluorescencia intrínseca de la TbTIM debido al apagamiento de la fluorescencia del W193. Esta hipótesis podría ser corroborada con la mutante W193F (para la cual se esperaría un incremento en la eficiencia cuántica). En este trabajo, también se construyó dicha mutante, sin embargo tanto la sobreexpresión como la purificación de la misma no fueron exitosas.

Tabla II. Porcentaje de exposición al solvente de los residuos triptofano en la TbTIM. La determinación de la superficie del área expuesta al solvente de las cadenas laterales de los residuos *W* de la TbTIM se realizó por medio del programa NACCESS (Simon Hubbard, University College, U.K.) implementando el algoritmo de Lee & Richards (1971) usando un radio de prueba de 1.4 Å y un ancho de corte de 0.1 Å. Estos valores se expresan como el porcentaje del área accesible al solvente de la cadena lateral del tripéptido Ala-Trp-Ala en una conformación extendida. Se usaron las coordenadas de la TbTIM a partir de la estructura 5TIM del PDB (Wierenga et al., 1991b).

Triptofanos de la TbTIM	Exposición al solvente (%)
W12 (interfase)	0.2
W90	9.5
W159	2.5
W170 (asa catalítica)	3.8
W193	18.6

Tabla III. Distancias entre el triptofano 193 y los triptofanos restantes de la TbTIM. Distancias entre el $C\alpha^2$ del W193 y el $C\alpha^2$ de los demás *Ws* en la TbTIM. Las coordenadas se tomaron de la estructura 5TIM del PDB (Wierenga et al., 1991b).

Par de triptofanos	Distancia (Å)*
W193-W12	33.0
W193-W90	20.2
W193-W159	6.1
W193-W170	22.3

3.5 Ensayos de estabilidad a la dilución de TbTIM, W12F y W12F/W193F

TbTIM

Para los ensayos de estabilidad a la dilución se utilizó un intervalo de concentración entre 0.0625 y 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TbTIM. Se determinó la actividad de la enzima a las 24 y 200 hrs de incubación.

A las 24 horas la TbTIM incubada entre 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mantiene más del 80 % de su actividad catalítica. Las concentraciones menores, entre 0.0625 y 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TbTIM pierden entre un 40 y un 50 % de su actividad durante estas primeras 24 hrs. (Fig. 4A símbolos llenos).

A las 200 hrs de incubación, la TbTIM incubada a altas concentraciones de proteína (20, 2 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) han perdido hasta un 40 % de actividad catalítica, mientras que las concentraciones menores a 1 $\mu\text{g TbTIM mL}^{-1}$ han perdido por completo su actividad catalítica (Fig. 4A símbolos vacíos).

W12F

La curva de dilución de la mutante W12F obtenida después de 24 horas de incubación, se divide prácticamente en dos partes (Figura 4 B): En la primera, la enzima mantiene entre el 70 y el 100 % de su actividad catalítica, y corresponde a las muestras con concentraciones mayores a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La W12F pierde por completo la actividad a partir de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por lo que es más inestable a dilución que la TbTIM. Es importante recordar que el W12 está sustituido en esta mutante por una F, y es un residuo que se puede considerar de la interfase. Aunque este residuo no tiene contacto con la otra subunidad, se encuentra en el

área de la interfase, por lo que no es de extrañarse que su sustitución provoque justamente una mayor sensibilidad a la dilución.

W12F/W193F

En la Figura 4C observamos que la actividad catalítica de la mutante W12F/W193F disminuye de manera gradual. Mientras la mutante W12F tiene un quiebre importante en la pérdida de la actividad como se mencionó antes, a $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ya que ha perdido completamente su actividad catalítica, la mutante W12F/W193F a esta misma concentración mantiene aún el 40 % de su actividad, y la pierde hasta tener un 10% solamente a $0.0625 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Si comparamos los resultados de las dos mutantes con la proteína silvestre, es claro que ambas mutantes son menos estables a la dilución, ya que a concentraciones menores a $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ en la proteína silvestre permanece más del 50 % de la actividad catalítica, mientras que las mutantes han perdido entre el 80 y 100% de su actividad.

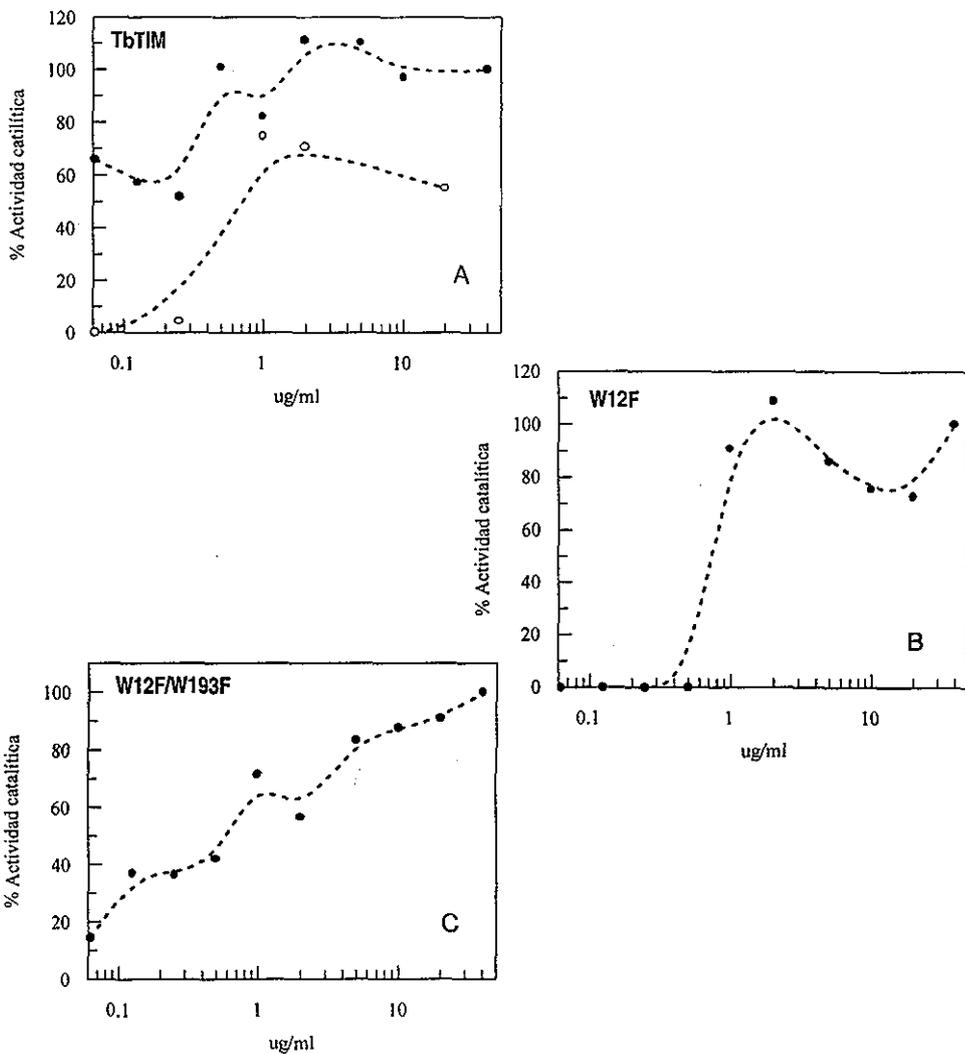


Figura 4. Estabilidad a la dilución. Resultados de la estabilidad a la dilución de la TbTIM (24 (●) y 200 horas (○)) y las mutantes W12F y W12F/W193F. Las muestras se incubaron a diferentes concentraciones de proteína y su actividad catalítica fue determinada después de 24 horas. Las líneas punteadas no son resultado de un ajuste.

3.6 Ensayos de reversibilidad de la TbTIM y W12F/W193F

Los ensayos de reversibilidad se llevaron a cabo con muestras de las diferentes etapas del patrón de desnaturalización (nativa, fase de transición y desplegada) durante el tiempo de incubación determinado para cada desnaturalizante (48 horas para GdnHCl y 200 horas para urea, ver discusión). Después de 24 hrs de la dilución del desnaturalizante, se determinó la actividad catalítica de estas muestras así como los espectros de fluorescencia intrínseca 300-400 nm (excitación 280 nm).

Las figuras 5 y 6 muestran la actividad catalítica y la longitud de onda de máxima emisión de las muestras renaturalizadas de la TbTIM (Fig.5) y de la W12F/W193F (Fig. 6) a diferentes concentraciones de urea durante 200 horas. La renaturalización de las proteínas se realizó a 50, 5 y 2 $\mu\text{g TIM mL}^{-1}$ durante 24 hrs en amortiguador TED 100/10/1 pH 7.4 a 25 °C.

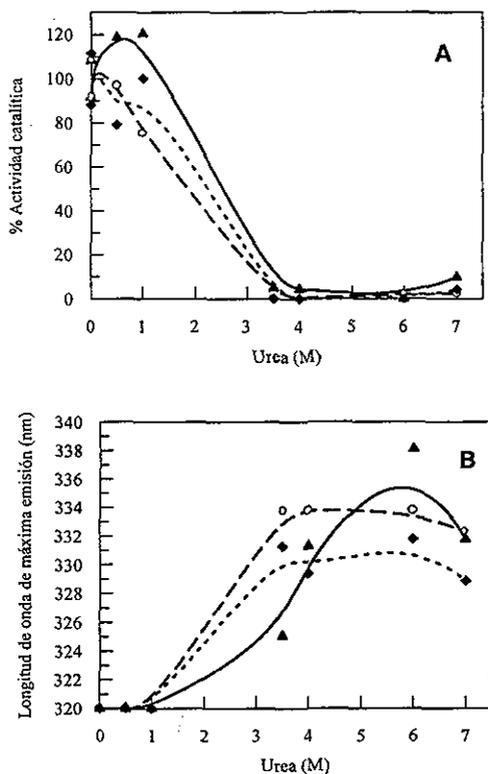


Figura 5. Recuperación de la actividad catalítica y $\lambda_{m\acute{a}x}$ de la TbTIM por la desnaturalización con urea. La renaturalización de la TbTIM a 50 (▲) 5 (○) y 2 (◆) $\mu\text{g mL}^{-1}$ se midió por actividad catalítica (A) y por el valor de $\lambda_{m\acute{a}x}$ de los espectros de emisión de fluorescencia (emisión 300-400 nm, excitación 280 nm) (B). Las líneas dibujadas no son el resultado de un ajuste.

Después de desnaturalizar a 0.5 y 1.0 M de urea, para las tres concentraciones de proteína empleadas, la TbTIM y la mutante W12F/W193F recuperó más del 80 % de la actividad catalítica. La dilución de las concentraciones intermedias (3.5 y 4.0 M) y altas (6.0 y 7.0 M) de urea, no permite la recuperación de los valores de actividad de las proteínas nativas. Esto se observa muy claramente en la actividad catalítica y el valor de $\lambda_{m\acute{a}x}$ de las muestras

incubadas entre 3.0 y 7.0 M de urea. La disminución de la concentración de TbTIM entre 2 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tampoco causa una recuperación de los parámetros en las muestras incubadas entre 3.5 y 7.0 M de urea.

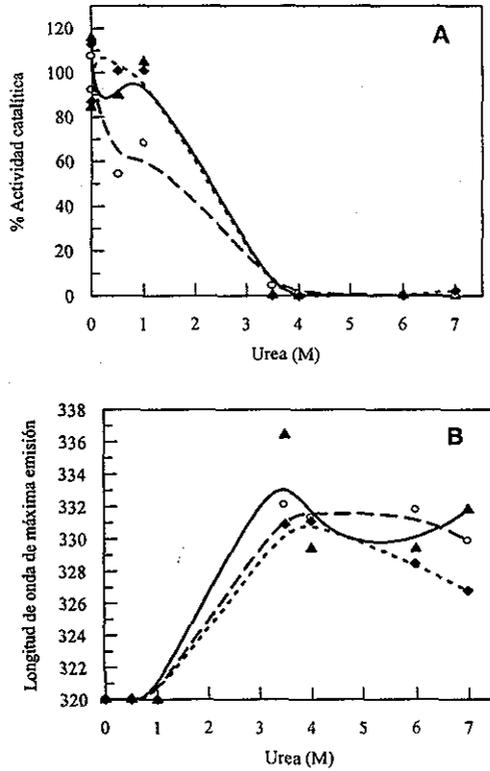


Figura 6. Recuperación de la actividad catalítica y $\lambda_{m\acute{a}x}$ de la mutante W12F/W193F por la desnaturalización con urea. La renaturalización de TbTIM a 50 (\blacktriangle), 5 (o) y 2 (\blacklozenge) $\mu\text{g mL}^{-1}$ se midió por actividad catalítica (A) y por el valor de $\lambda_{m\acute{a}x}$ de los espectros de emisión de fluorescencia (emisión 300-400 nm, excitación 280 nm) (B). Las líneas continua y punteadas no son el resultado de un ajuste.

La reversibilidad después de la desnaturalización para GdnHCl se muestra en las Figuras 7 (TbTIM) y 8 (W12F/W193F). Para la TbTIM se observa un porcentaje de recuperación de la actividad (Fig. 7A) de más del 80 % entre 0 y 0.5 M de GdnHCl. Para las concentraciones intermedias de GdnHCl (entre 1.3 y 1.5 M) no hay recuperación de la actividad catalítica en cualquiera de las concentraciones de proteína usadas. Sin embargo, a 4.0 y 6.0 M de desnaturalizante hay una recuperación del 20 % de la actividad a 5 μg TbTIM mL^{-1} y de 60% a 2 μg TbTIM mL^{-1} . La recuperación del valor de $\lambda_{\text{máx}}$ de la proteína nativa (Fig. 7B) muestra el mismo comportamiento, es decir, a bajas concentraciones de desnaturalizante se recupera el valor de 320 nm, mientras que entre 1.3 y 1.5 M de GdnHCl el valor de $\lambda_{\text{máx}}$ es de hasta más de 330 nm. La incubación a altas concentraciones de GdnHCl (4.0 y 6.0 M) indica que conforme disminuye la concentración de proteína se recupera el valor de $\lambda_{\text{máx}}$ de la proteína nativa. Es decir, a una concentración de TbTIM de 2 μg mL^{-1} se recupera el valor original.

En resumen, a menor concentración de proteína en el paso de renaturalización, la TbTIM recupera un mayor porcentaje de actividad catalítica y su valor de $\lambda_{\text{máx}}$. Sin embargo, la incubación entre 1.0 y 2.0 M de GdnHCl muestra que la desnaturalización de la TbTIM es irreversible.

En la mutante W12F/W193F (Fig. 8 A y B), sólo para la renaturalización a 5 μg mL^{-1} se observa una renaturalización del 60 % a 4.0 y 6.0 M de GdnHCl. Para todos los casos, a 1.3 y 1.5 M de GdnHCl, la doble mutante pierde actividad por completo, y al igual que en

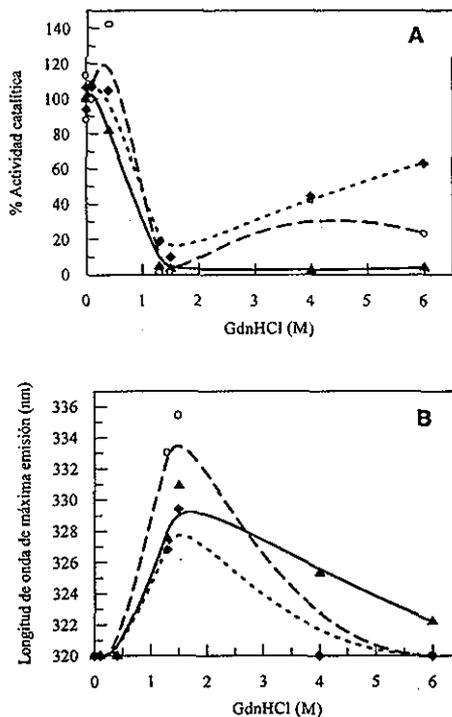


Figura 7. Recuperación de la actividad catalítica y $\lambda_{\text{máx}}$ de la TbTIM por la desnaturalización con GdnHCl. La renaturalización de la TbTIM a 50 (▲—) 5 (○---) y 2 (◆----) $\mu\text{g mL}^{-1}$ se midió por actividad catalítica (A) y por el valor de $\lambda_{\text{máx}}$ de los espectros de emisión de fluorescencia (emisión 300-400 nm, excitación 280 nm) (B). Las líneas continua y punteadas no son resultado de un ajuste.

la proteína silvestre, sólo entre 0 y 0.5 M el porcentaje de recuperación de la actividad es considerable.

El valor de $\lambda_{\text{máx}}$ se recupera sólo para este mismo caso (5 $\mu\text{g TIM mL}^{-1}$ y 4.0 y 6.0 M).

En general el comportamiento es el mismo, las altas concentraciones de proteína tanto la TbTIM silvestre como la mutante W12F/W193F afectan el nivel de recuperación de los

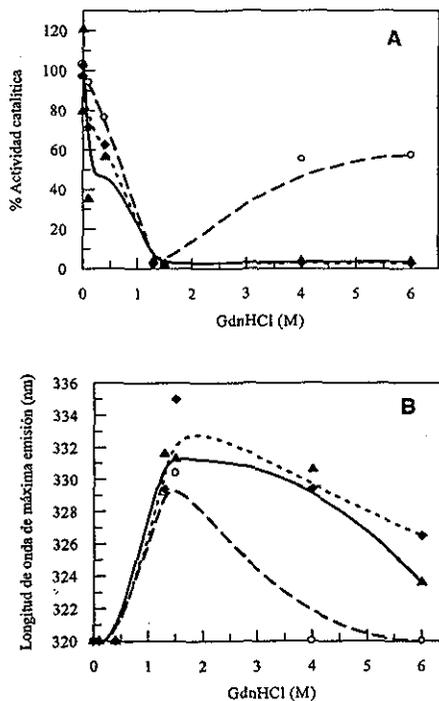


Figura 8. Recuperación de la actividad catalítica y $\lambda_{\text{máx}}$ de la mutante W12F/W193F por la desnaturalización con GdnHCl. La renaturalización de la proteína a 50 (▲—) 5 (○---) y 2 (◆---) μg TbTIM mL^{-1} se midió por actividad catalítica (A) y por el valor de $\lambda_{\text{máx}}$ de los espectros de emisión de fluorescencia (emisión 300-400 nm, excitación 280 nm) (B). Las líneas continua y punteadas no son resultado de un ajuste.

parámetros cuantificados. En la doble mutante, la concentración de proteína óptima es 5 μg mL^{-1} , y no 2 μg TIM mL^{-1} . Esto se debe a que a 2 μg mL^{-1} la mutante W12F/W193F ha perdido aproximadamente el 50% de actividad aún en ausencia del desnaturalizante como lo muestran los resultados de estabilidad a la dilución (Fig. 4C).

En resumen, con excepción del intervalo entre 0 y 1.5 M urea y entre 0 y 0.6 M GdnHCl en el cual hay entre un 80-100% de renaturalización, ninguna de las otras muestras

recupera las señales características de la enzima nativa. Con esto se concluye que el proceso de desnaturalización de la TbTIM en urea y GdnHCl es irreversible.

Existe la posibilidad de que la irreversibilidad sea causada por reacciones de degradación química, resultado de los largos tiempos de incubación (principalmente en urea), por lo que la actividad catalítica de las muestras renaturalizadas se determinó también durante períodos cortos (entre 3 y 24 hrs) de desnaturalización con urea. Para estos tiempos cortos de incubación se observó un bajo nivel de reactivación que muestra ser independiente de los tiempos de desnaturalización. Esto nos indica que la irreversibilidad de la reacción es causada muy probablemente por un plegamiento inadecuado y por la asociación incorrecta de la TbTIM (datos no mostrados). Desgraciadamente, la degradación química de la TbTIM a tiempos largos no puede descartarse con este experimento.

3.7 Despliegamiento de la TbTIM y de las mutantes W12F y W12F/W193F

El patrón de desnaturalización de la TbTIM y de las mutantes W12F y W12F/W193F se midió por dicroísmo circular, actividad catalítica, determinación del SCM, intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{máx}}$ así como por unión de ANS. La determinación de valores de DC, actividad catalítica y fluorescencia intrínseca de las muestras ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en TED 20/1/1 pH 7.4) de la TbTIM y las mutantes W12F y W12F/W193F incubadas a las diferentes concentraciones de urea o GdnHCl se hicieron paralelamente, a partir de la misma muestra, durante el mismo día. La siguiente parte de los resultados está dividida por el desnaturalizante utilizado, se presentan los resultados obtenidos usando urea en la primera parte y posteriormente los obtenidos en GdnHCl.

3.7.1 Desplegamiento inducido por urea

Dicroísmo circular

El despliegamiento de la TbTIM, así como de las mutantes W12F y W12F/W193F en urea se siguió por DC en la región del UV lejano. El valor de elipticidad a 222 nm para cada una de las muestras se usó para calcular los valores de F_{Napp} (Figura 9). Los cambios en la estructura secundaria de las tres proteínas no son monofásicos, es decir, se observan claramente dos transiciones, sugiriendo fuertemente la presencia de por lo menos un intermediario. En concentraciones entre 2.0 y 5.0 M de urea se observa una región de plataforma en la señal de DC en la cual los cambios en la elipticidad son pequeños. Los resultados de la Figura 9 muestran que la región de plataforma se incrementa y se vuelve más evidente en el orden TbTIM<W12F<W12F/W193F. La sustitución de un W hace más sensible a la proteína con respecto a la acción del desnaturalizante. Y como se puede observar, la sustitución de dos residuos W la hace todavía más sensible que la mutante sencilla y que la silvestre, aunque las constantes catalíticas (Tabla I) entre esta última y las mutantes pueden considerarse equivalentes. Los valores de $C_{1/2}$ de las dos transiciones observadas por DC se listan en la Tabla IV.

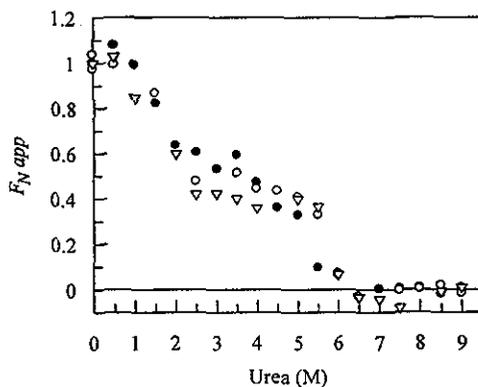


Figura 9. Despliegamiento de la TbtTIM en urea seguido por DC en la región de UV lejano. La fracción aparente de moléculas nativas ($F_{N\text{ app}}$) se calculó con la ecuación $F_{N\text{ app}} = Yx - Yw/Yn - Yu$, se muestra la $F_{N\text{ app}}$ calculada a partir de la ecuación $F_{N\text{ app}} = Yx - Yw/Yn - Yu$ donde Yu es la señal de la proteína desnaturizada, Yn es la señal de la proteína nativa y Yx la señal a X concentración de desnaturilizante, usando los valores de elipticidad a 222 nm (θ_{222}) de la desnaturización de la TbtTIM (●) y las mutantes W12F (○) W193F (▽) incubadas 200 horas en urea (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Unión de ANS

La literatura reporta que la fluorescencia del ANS aumenta conforme disminuye la polaridad del solvente (Stryer, 1965). Esta característica ha resultado útil para detectar la presencia de intermediarios (Ptitsyn et al., 1990, Semisotnov et al., 1991) ya que la unión de ANS a intermediarios del plegamiento está acompañado por un incremento en la intensidad de fluorescencia de esta molécula, ya que se une a regiones hidrofóbicas parcialmente expuestas de la proteína (Chávez-Cárdenas, 1998). El ANS no muestra una fluorescencia significativa se une a proteínas nativas, en las que las regiones hidrofóbicas

están totalmente ocultas al solvente, o a proteínas desnaturizadas en las que las regiones hidrofóbicas están totalmente solvatadas.

La fluorescencia del ANS en presencia de TbTIM y W12F, W12F/W193F incubadas en diferentes concentraciones de urea se muestra en la Figura 10. En las tres proteínas observamos un incremento en la fluorescencia del ANS a concentraciones intermedias de desnaturizante. A concentraciones entre 2.0 y 5.0 M de urea, se observa un máximo en la intensidad de fluorescencia para la TbTIM. Para la W12F y la W12F/W193F el aumento en la señal del ANS es mayor a partir de 1.5 o 1.0 M de urea respectivamente.

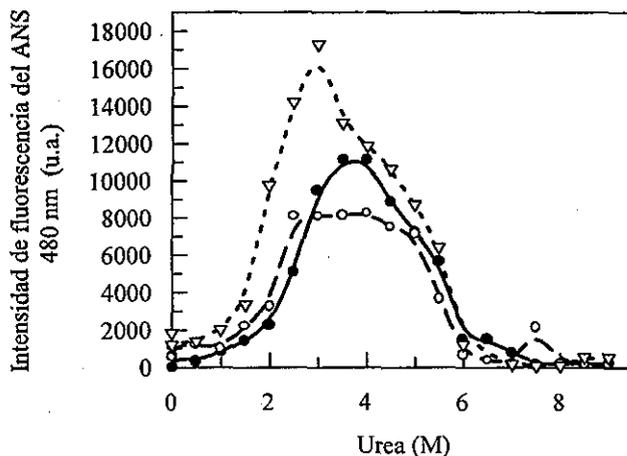


Figura 10. Incremento en la fluorescencia de ANS por la incubación a diferentes concentraciones de urea. 100 μM de ANS se añadió a las muestras ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en TED 20/1/1 pH 7.4) de TbTIM (●), W12F (○) y W12F/W193F (▽) incubadas 200 horas a las diferentes concentraciones de urea. La intensidad de fluorescencia del ANS se determinó a 480 nm (λ excitación= 360 nm).

Las mutantes se desnaturalizan a menores concentraciones de urea (como se observó en la figura 9), aparentemente las mutaciones disminuyen la "estabilidad" de la conformación nativa, por lo que el equilibrio se mueve hacia el intermediario (I) permitiendo que éste se observe.

Por otra parte, la fluorescencia del ANS es mayor en W12F/W193F que en W12F y que en TbTIM (Fig. 10). Puede ser que el (los) intermediario(s) presente(s), tengan una mayor superficie hidrofóbica expuesta al solvente, o bien que su concentración sea mayor.

Las concentraciones de desnaturalizante en las cuales se observa el máximo de fluorescencia de ANS, corresponden a la región en plataforma observada en los resultados obtenidos por DC (Figura 9).

Actividad catalítica

El método para calcular la actividad catalítica para las muestras incubadas en presencia de desnaturalizante se describe en la sección de Material y Métodos (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000). Este método es de gran importancia ya que es necesario diluir la muestra, de la concentración usada para medir los parámetros espectroscópicos (50 mg mL^{-1}) a la concentración usada para medir actividad catalítica ($5 \text{ ng TbTIM mL}^{-1}$).

La actividad catalítica de la TbTIM y sus mutantes después de la incubación en diferentes concentraciones de urea se observa en la Figura 11. Al igual que lo observado por DC, la actividad catalítica de la doble mutante W12F/W193F se pierde a concentraciones menores de desnaturalizante que en la W12F o en la TbTIM. Es claro que para la actividad catalítica (y a diferencia de la figura 9), existe una sola transición donde se

pierde prácticamente toda la actividad catalítica. Los valores de $C_{1/2}$ para la transición observada en cada una de las enzimas se observa en la Tabla IV.

La actividad catalítica de la TIM se ha atribuido siempre al dímero nativo (Zabori *et al.*, 1980), por otro lado, ninguna de las proteínas muestra actividad catalítica en la región de plataforma detectada por DC (Figura 9) que corresponde también al máximo de unión de ANS (Figura 10). Esto indica que el o los intermediarios observados entre 2.0 y 5.0 M de urea prácticamente no presentan actividad catalítica.

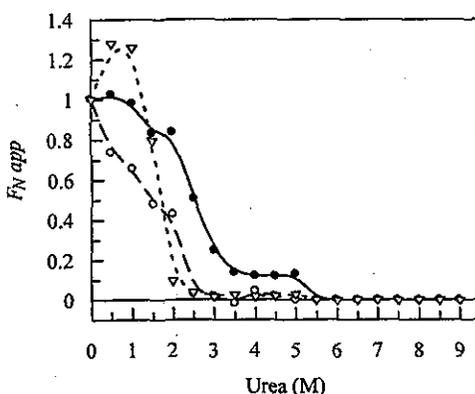


Figura 11. Actividad catalítica durante el desplegamiento de la TbTIM y las mutantes W12F y W12F/W193F. Actividad catalítica de la de TbTIM (●), W12F (○) y W12F/W193F (▽) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en TED 20/1/1 pH 7.4) incubadas 200 horas a las diferentes concentraciones de urea. La fracción aparente de moléculas nativas (F_{Napp}) se calculó con la ecuación $F_{Napp} = Yx - Yw/Yn - Yu$.

Fluorescencia intrínseca

En ausencia de desnaturante, el espectro de emisión de fluorescencia de la TbTIM tiene su $\lambda_{\text{máx}}$ a 322 nm (Figura 3 B y Tabla I). A concentraciones de desnaturante entre 4.0 y 6.0 M GdnHCl o entre 8.0-9.0 M urea, el valor de $\lambda_{\text{máx}}$ llega hasta 356 nm y el valor

de intensidad de fluorescencia disminuye considerablemente. Esto indica la exposición completa de los residuos W al solvente.

El centro espectral de masa (SCM) es semejante para la TbTIM y sus mutantes (Tabla I). El efecto de la urea en el SCM se observa en la Figura 12A, en la cual se puede observar que entre 0 y 2.0 M de urea el cambio en SCM es apenas perceptible. Entre 2.0 y 6.0 M de urea hay un aumento del valor de SCM y un evidente escalón. A partir de 6.5 M de urea los cambios también son muy ligeros. Las concentraciones de urea a las cuales se observa el cambio más drástico y el escalón en los valores de SCM son las mismas concentraciones donde se observa la meseta por DC (Figura 9) y la máxima unión de ANS (Figura 10). La gráfica sugiere (Fig. 12A) que hay un intermediario visto por cambios en el SCM a lo largo del aumento de la concentración del desnaturalizante. Se calcularon los valores de F_{Napp} para obtener el valor de $C_{1/2}$ de las dos transiciones observadas para cada una de las proteínas (Tabla IV).

El efecto de la urea en la intensidad de fluorescencia de TbTIM y de las mutantes W12F y W12F/W193F se muestra en la Figura 12B. Para la TbTIM, los cambios en la fluorescencia para el desplegamiento con urea muestran dos transiciones de similar amplitud. La primera, entre 2.0 y 2.5 M y la segunda entre 4.5 y 6.0 M de urea (Figura 12B ●). La mutante W12F, muestra una sola transición entre 4.0 y 6.0 M de urea (○). Por último, el patrón de desnaturalización de la mutante W12F/W193F (▽) es similar al de la TbTIM. Sin embargo, la amplitud de la primera transición es menor.

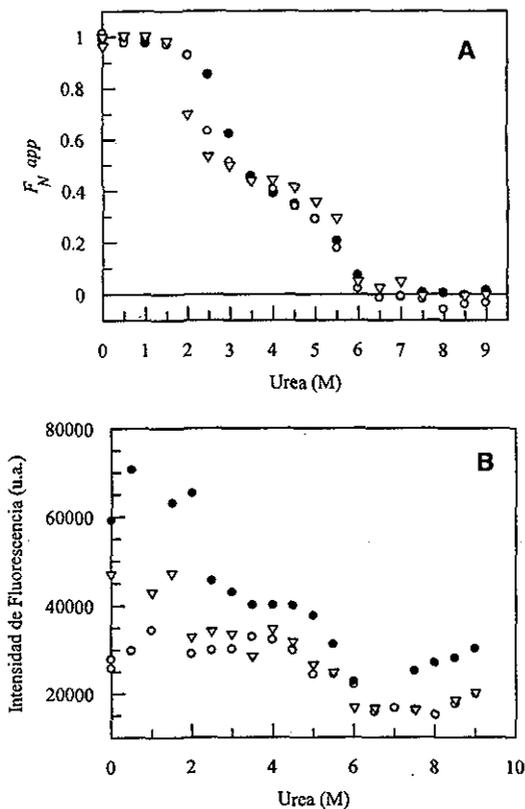


Figura 12. Desplegamiento de la TbTIM y las mutantes W12F y W12F/W193F seguido por cambios en la fluorescencia intrínseca. Se determinaron los espectros de fluorescencia intrínseca (emisión 310-400 nm, excitación 295 nm) de las muestras incubadas 200 horas. TbTIM (●), W12F (○) y W12F/W193F (▽) (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en TED 20/1/1 pH 7.4). En A se grafican los cambios en el SCM como respuesta al incremento en la concentración de urea. Se muestra la F_{Napp} calculada a partir de la ecuación $F_{Napp} = Y_x - Y_u / Y_n - Y_u$ para calcular el valor de $C_{1/2}$ de cada una de las transiciones, donde Y_u es la señal de la proteína desnaturalizada, Y_n es la señal de la proteína nativa y Y_x la señal a X concentración de desnaturante. El valor de SCM se calculó a partir de la fórmula $SCM = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)}$ (ver Material y Métodos). B. Intensidad de fluorescencia a 322 nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El objetivo inicial de comparar los patrones de desnaturalización obtenidos por fluorescencia de la TbTIM y las dos mutantes, fue tratar de dilucidar qué regiones de la proteína se exponen al solvente a lo largo de la curva de desnaturalización. Es claro que el patrón de desnaturalización involucra por lo menos un intermediario, y que el intervalo donde éste se observa tanto por SCM como por IF, corresponde a la región en la que se identificó por DC y fluorescencia del ANS. Apoyados en la identificación del W193 como apagador de la fluorescencia del W159 (Figura 3B y Tabla III) así como de los triptofanos expuestos u ocultos al solvente (Tabla II), proponemos un patrón de desnaturalización para la TbTIM al incrementar la concentración de urea. Esta hipótesis se expone y explica en la sección de Discusión.

Tabla IV. Valores de $C_{1/2}$ de las transiciones, calculados a partir de los valores de F_{Napp} para la desnaturalización inducida por urea obtenidos por actividad catalítica (Fig. 11), fluorescencia (Fig 12 A) y DC (Fig. 9).

	Primera transición	Segunda transición
	[Urea] _{1/2}	[Urea] _{1/2}
Actividad [Urea] _{1/2}	wt 2.5 W12F 1.5 W12F/W193F 1.5	No detectable
DC [Urea] _{1/2}	wt 1.88 W12F 1.75 W12F/W193F 1.55	wt 5.2 W12F 5.6 W12F/W193F 5.75
SCM [Urea] _{1/2}	wt 2.8 W12F 2.3 W12F/W193F 2.0	wt 5.5 W12F 5.3 W12F/W193F 5.6

3.7.2 Desplegamiento inducido por GdnHCl

Dicroísmo circular

La desnaturalización de la TbTIM y las mutantes W12F, W12F/W193F inducida por GdnHCl se siguió por DC en la región de UV lejano. Los cambios en los valores de la elipticidad a 222 nm se usaron para determinar la fracción aparente de moléculas en el estado nativo (F_{Napp}) (Figura 13). Es claro que el patrón de desnaturalización no es monofásico, pues presenta una meseta que es más evidente en el orden W12F/W193F > W12F > TbTIM. Al igual que en urea, la doble mutante es más sensible al desnaturalizante que la W12F y la TbTIM silvestre. Por otro lado el patrón de desnaturalización bifásico sugiere la presencia de por lo menos un intermediario.

La plataforma se observa a concentraciones de GdnHCl entre 1.0 y 2.0 M. Los espectros de dicroísmo circular de la proteína sin desnaturalizante y a 1.2, 1.4 y 1.8 M de GdnHCl, se utilizaron para calcular el porcentaje de α hélice mediante los programas CDNN y CDstr (Bohm *et al.*, 1992., Johnson, W.C., 1999). Este análisis indicó que el contenido de α hélice disminuye hasta casi un 50 %. Los valores de $C_{1/2}$ para las dos transiciones observadas indican que el valor de $C_{1/2}$ de la primera transición es menor en la proteína silvestre (Tabla V). Por otro lado, los valores de $C_{1/2}$ de la segunda transición son prácticamente similares para las tres enzimas indicando que la meseta, que es más evidente en la doble mutante que en la mutante sencilla y que en la TbTIM silvestre, es el resultado de la desestabilización de la proteína nativa.

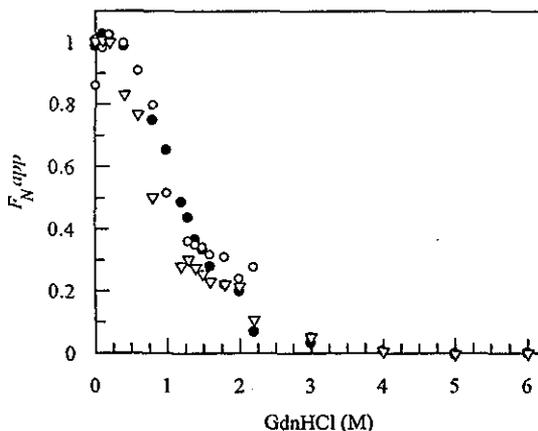


Figura 13. Cambios en la señal de diroísmo circular en el UV lejano como función del aumento en la concentración de GdnHCl. La fracción aparente de moléculas nativas (F_{Napp}) se calculó con la ecuación $F_{Napp} = Yx - Yy / Yn - Yu$ (ver pie de figura de la Fig. 9) usando los valores de elipticidad a 222 nm (θ_{222}) de la desnaturalización de la TbTIM (●) y las mutantes W12F (○) W12F/W193F (▽) incubadas 48 horas en GdnHCl (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Unión de ANS

Para reforzar la hipótesis sobre la existencia de un intermediario en la desnaturalización de la TbTIM se utilizó la unión y fluorescencia de ANS. La Figura 14 muestra el aumento en la fluorescencia del ANS en presencia de la TbTIM y las dos mutantes después de la incubación a diferentes concentraciones de GdnHCl. Como se puede observar, las tres proteínas tienen un pico máximo de fluorescencia del ANS a concentraciones entre 1.0 y 2.0 M de GdnHCl, es decir, a las mismas concentraciones donde se observó la plataforma en la Figura 13. El intervalo donde se observa este aumento en la fluorescencia se incrementa en el orden TbTIM < W12F < W12F/W193F (Fig. 14) y la fluorescencia del ANS es mayor para la mutante W12F/W193F que para la mutante sencilla y la proteína

silvestre. Como en el caso de los resultados con urea, esta fluorescencia mayor puede deberse a que el (o los) intermediario(s) tienen una superficie hidrofóbica expuesta mayor o a que existe una mayor fracción de moléculas en este estado (o estados).

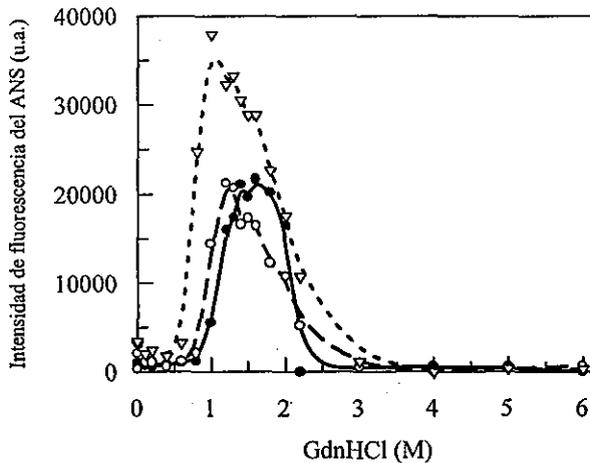


Figura 14. Incremento en la fluorescencia del ANS a diferentes concentraciones de GdnHCl. Las muestras de TbTIM (●), W12F (○) W12F/W193F (▽) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) se incubaron 48 horas a diferentes concentraciones de GdnHCl. Se añadió ANS $100 \mu\text{M}$ y se midió la intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación = 360 nm , longitud de onda de emisión = 480 nm).

Actividad catalítica

La figura 15 muestra la actividad catalítica de la TbTIM y las mutantes W12F y W12F/W193F después del período de incubación con GdnHCl (48 hrs). Como se puede observar, (Fig. 15) en el patrón seguido por actividad existe una sola transición. Los valores de $C_{1/2}$ calculados para esta única transición indican que la W12F/W193F pierde su

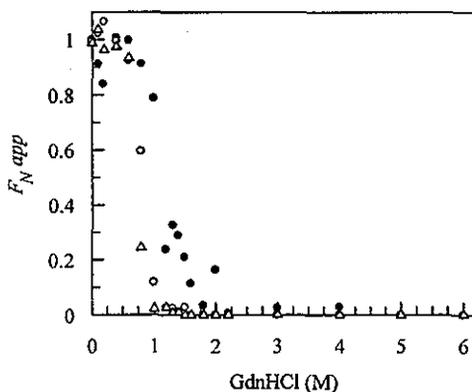


Figura 15. Actividad catalítica durante el desplegamiento de la TbTIM y las mutantes W12F y W12F/W193F. Actividad catalítica de la de TbTIM (\bullet), W12F (\circ) y W12F/W193F (∇) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en TED 20/1/1 pH 7.4) incubadas 48 horas a las diferentes concentraciones de GdnHCl. La fracción aparente de moléculas nativas (F_{Napp}) se calculó con la ecuación $F_{Napp} = Yx - Yw/Yn - Yu$ (ver pie de figura de la Fig. 9)

actividad catalítica a menores concentraciones de desnaturalizante ($C_{1/2} = 0.75 \text{ M}$) que la mutante sencilla W12F ($C_{1/2} = 0.82 \text{ M}$) o que la TbTIM ($C_{1/2} = 1.08 \text{ M}$) (Tabla V). Este mismo comportamiento se observa para los valores de $C_{1/2}$ obtenidos por DC.

Fluorescencia intrínseca

El cambio en la fluorescencia intrínseca de la TbTIM y las dos mutantes se siguió a partir del espectro de fluorescencia (Figura 16A) y mediante la intensidad de la fluorescencia (IF) a 322 nm (λ_{max} de la proteína nativa) (Fig. 16B)

El SCM de las proteínas nativas es 336.7 nm (Tabla I) y cambia a 358 nm en 6.0 M de GdnHCl. La curva de desnaturalización obtenida por el cambio en el SCM no es monofásica. La meseta es poco evidente para la TbTIM silvestre, sin embargo es muy clara

para las dos mutantes. La comparación de las tres enzimas muestra que la transición es más evidente W12F/W193F que en W12F y que en la TbTIM. De acuerdo con esta observación, los valores de $C_{1/2}$ obtenidos son diferentes para las tres enzimas (Tabla V), sin embargo son muy similares con los valores de $C_{1/2}$ obtenidos por las diferentes técnicas para cada una de las proteínas (Tabla V). Esto apoya una vez más la propuesta de que la sustitución de los residuos W en la TbTIM provoca una desestabilización de la proteína nativa.

En contraste, la segunda transición, es muy similar en las tres enzimas, de hecho, las curvas prácticamente se sobreponen, lo que nos indica que a estas concentraciones de GdnHCl la desnaturalización de las tres enzimas se lleva a cabo a partir del mismo conformero, probablemente un monómero. El efecto de la GdnHCl en la IF de la TbTIM silvestre, y de las mutantes W12F y W12F/W193F se observa en la figura 16B. La TbTIM silvestre tiene un patrón de desnaturalización con dos transiciones, y el punto de inflexión se observa a 1.5 M de GdnHCl sugiriendo una vez más la presencia de un intermediario. La W12F presenta una sola transición cuyo valor de $C_{1/2}$ es de 2.0 M (Tabla V). La mutante W12F/W193F presenta dos transiciones, la primera se encuentra entre 0.2 y 1.0 M de GdnHCl. Se observa una meseta entre 1.0 y 1.8 M. Finalmente, entre 1.8 y 3.0 M de GdnHCl se observa la segunda transición. La comparación de los perfiles obtenidos para las tres enzimas nos permitió proponer una hipótesis sobre la exposición gradual de los residuos W al incrementar las concentraciones de GdnHCl que se aborda en la sección de Discusión.

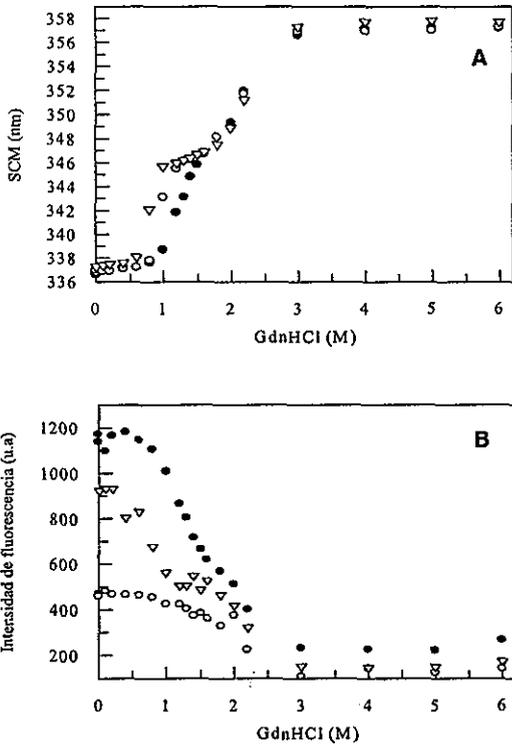


Figura 16. Desnaturalización por GdnHCl de la TbTIM y las mutantes W12F y W12F/W193F seguida por fluorescencia intrínseca. Se obtuvieron espectros de emisión (310-400 nm , excitación 295 nm) de las muestras de TbTIM (●), W12F (○) W12F/W193F (▽) (50 µg mL⁻¹) incubadas 48 horas a diferentes concentraciones de GdnHCl . En A se grafica el valor de SCM a diferente concentración de GdnHCl. El valor de SCM se calculó a partir de la fórmula $SCM = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)}$ (ver Material y Métodos). B. Intensidad de fluorescencia a 322 nm.

3.8 Cromatografía de exclusión (CE-FPLC)

3.8.1 Calibración de la columna

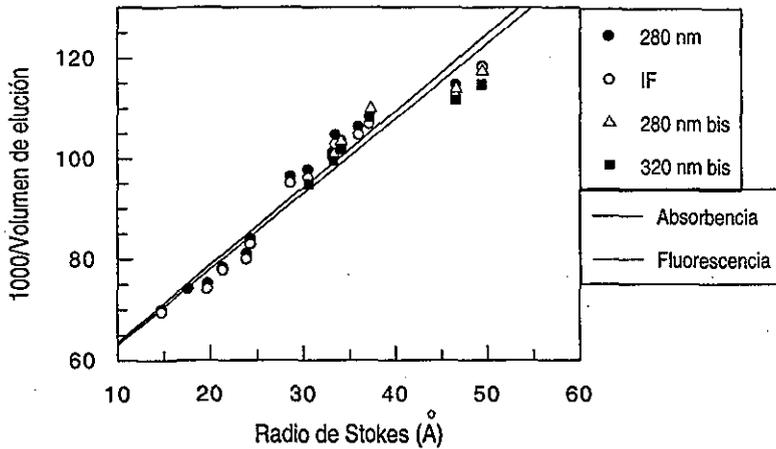
La columna Superdex 75 se calibró en presencia y ausencia de desnaturizante (GdnHCl 6.0 M) como se explicó en la sección de Material y Métodos. Se siguieron dos señales, IF (excitación 280 nm, emisión 320 nm) y UV 280 nm. La señal de IF es más sensible que la de UV 280 nm, por lo que se utilizó esta señal y su correspondiente curva de calibración. Las curvas obtenidas para las proteínas en presencia (6.0 M GdnHCl) o ausencia de GdnHCl (Fig. 17) indican que las propiedades de permeación de la columna no dependen de la presencia del desnaturizante, por lo que es posible utilizar una sola curva que incluya la dependencia de la velocidad de migración ($1000/V_{el}$) vs. el radio de Stokes (R_s) para todas las muestras.

La ecuación que describe los cromatogramas seguidos por fluorescencia es la siguiente:

$$1000/V_{el} = (1.4934)R_s + 48.1495 \quad (2)$$

La determinación del radio de Stokes con la columna Superdex 75 mostró una muy buena correlación con el reportado en la literatura, por lo que puede ser usada para determinar las dimensiones de las proteínas en su estado nativo y desnaturizado. Por otro lado se observó que el límite de resolución de la columna es de un R_s de aproximadamente 54 Å. A partir de 47 Å, la resolución es muy baja.

Radio de Stokes vs. Vol. elución nativas y desnaturalizadas
 Nativas TED100/10/1 pH 7.4 & Desnaturalizadas GdnHCl
 6M TED 100/10/1 pH 7.4 Flujo 0.4 mL/min



Coefficiente de correlación (r) = 0.9745 UV (280 nm)

Variable	Valor	Err.Est.
Ordenada al origen (b)	48.2545	3.0884
Pendiente (m)	1.5298	0.0977

Coefficiente de correlación (r) = 0.9734

Variable	Valor	Err. Est.
		IF (320 nm)
Ordenada al origen (b)	48.1495	3.2848
Pendiente (m)	1.4934	0.1014

Figura 17. Curva de calibración para condiciones nativas y desnaturalizantes de la columna Superdex 75. Volumen de elución vs. radio de Stokes (Å) seguido por intensidad de fluorescencia a 320 nm (excitación 280 nm) y UV 280 nm de las proteínas nativas ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ en TED 100/10/1 pH 7.4) y desnaturalizadas ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ en 6.0 M de GdnHCl en TED 100/10/1 pH 7.4).

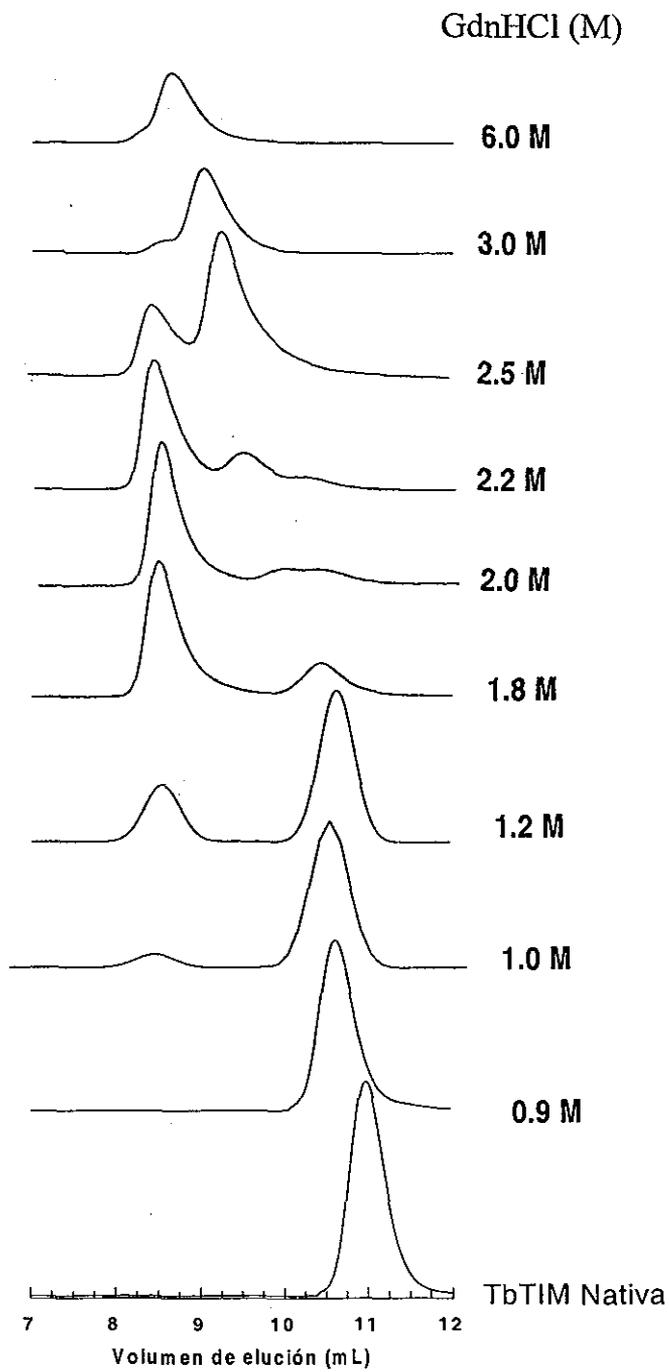
3.8.2 Características hidrodinámicas de la TbTIM

Para conocer el estado de asociación de el o los intermediarios presentes a lo largo de la curva de desnaturalización por GdnHCl de la TbTIM, los experimentos de cromatografía se llevaron a cabo con la TbTIM y con la mutante monomérica RMMO-1TIM (Saab *et al.*, 2001). El perfil de elución de la RMMO-1TIM a diferentes concentraciones de GdnHCl muestra un solo pico de elución a todas las concentraciones usadas (datos no mostrados). La Figura 18 muestra perfiles de elución representativos para la TbTIM. Como se puede observar, entre 0 y 0.9 M de GdnHCl se observa un solo pico de elución (*D*) que se mueve a menores volúmenes de elución, indicando que la especie que eluye en ese pico aumenta gradualmente sus dimensiones. En la concentración de 1.0 M aparece un nuevo pico (*A*), cuyo volumen de elución es fijo conforme aumenta la concentración de GdnHCl de 1.0 a 2.5 M.

A las concentraciones de 2.0 y 2.2 M de GdnHCl se observan tres picos (*A*, *D** y *M**). En 2.5 M de GdnHCl el pico llamado *D** ha desaparecido, *A* disminuyó y *M** es la población mayoritaria. *M** disminuye su volumen de elución conforme aumenta la concentración de GdnHCl. La identificación de estos picos se explica más adelante.

Página siguiente

Figura 18. Cromatograma de la TbTIM a diferentes concentraciones de GdnHCl. Las muestras de TbTIM (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se incubaron a diferentes concentraciones de GdnHCl durante 48 horas. Las muestras se inyectaron a la columna Superdex 75 equilibrada con la misma concentración de desnaturalizante. En esta figura sólo se muestran cromatogramas de concentraciones de GdnHCl representativas.



Radio de Stokes

El radio de Stokes se calculó a partir del volumen de elución y la ecuación 2 (ver sección de Material y Métodos). En la Figura 19 se observan los valores obtenidos, graficados en función del aumento en la concentración de GdnHCl.

En ausencia de desnaturante, la RMMO-1TIM tiene un R_s de 19.9 Å. El incremento en la concentración de GdnHCl provoca una transición monofásica entre 1.0 y 3.0 M de GdnHCl mientras que a 6.0 M su R_s es 44.0 Å (Fig. 19, ◇). Por otro lado, en ausencia de desnaturante, la TbTIM nativa (*D*) tiene un R_s de 29.6 Å. El valor de R_s de este pico aumenta de 29.6 Å a 30.8 Å en GdnHCl 0.9 M (Figura 19, ●), [lo que indica que *D* es ahora un dímero expandido (*D*^{*})].

Como se observó en la Figura 18, a partir de una concentración de GdnHCl de 1.0 M existe más de una especie en el patrón de desnaturación:

- 1) *D*^{*}, cuyo R_s aumenta de 30.8 a 34.1 Å conforme la concentración de GdnHCl aumenta de 1.0 a 2.2 M, sugiriendo que *D*^{*} es un dímero expandido (● Fig. 19)
- 2) Una especie de alto peso molecular (*A*), cuyo R_s es constante (46.7 Å en promedio). Esta especie (*, Fig. 19) tiene un R_s mayor que el de la proteína en GdnHCl 6.0 M, por lo que suponemos que es un agregado. Por otro lado, eluye en el límite de resolución de la columna por lo que puede ser una mezcla de especies grandes que no se alcanzan a diferenciar.
- 3) La tercera población se denominó *M*^{*} (■ Figura 19), los valores de R_s de esta especie son intermedios a los mostrados por *D*^{*} y *A*. *M*^{*} aparece a 2.0 M de GdnHCl y coexiste con *D*^{*} a 2.0 y 2.2 M de desnaturante.

La comparación de los R_s obtenidos para M^* con los de la mutante monomérica RMMO-1TIM muestra que a partir de concentraciones de GdnHCl de 2.0 M los valores de M^* y de RMMO1-TIM (Comparar ■ y ◇ en Fig. 19) se sobrepone. Esto nos permite suponer que M^* es un monómero desplegado y que a partir de 2.0 M de GdnHCl se observa la desnaturalización de este estado.

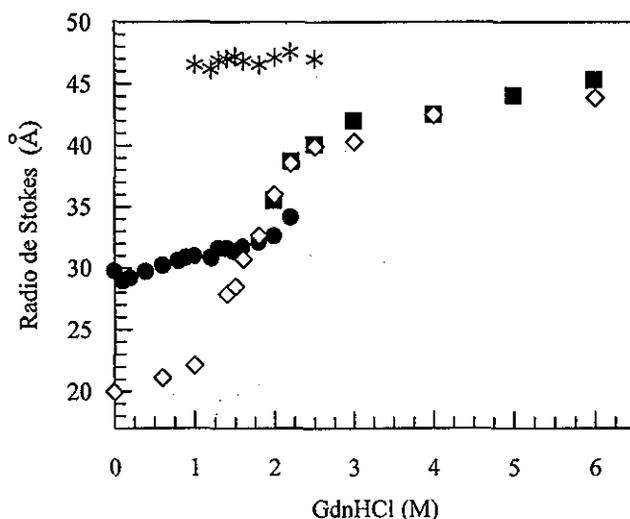


Figura 19. Cromatografía de exclusión de la TbTIM y la mutante monomérica RMMO1-TIM a diferentes concentraciones de GdnHCl. Las muestras de TbTIM (*, ■ y *) y de RMMO-1 TIM (◇) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) se incubaron a diferentes concentraciones de GdnHCl durante 48 horas. Las muestras se inyectaron a la columna Superdex 75 equilibrada con la misma concentración de desnaturalizante. Los radios de Stokes se calcularon a partir de los volúmenes de elución y la ecuación (2) (ver Material y Métodos).

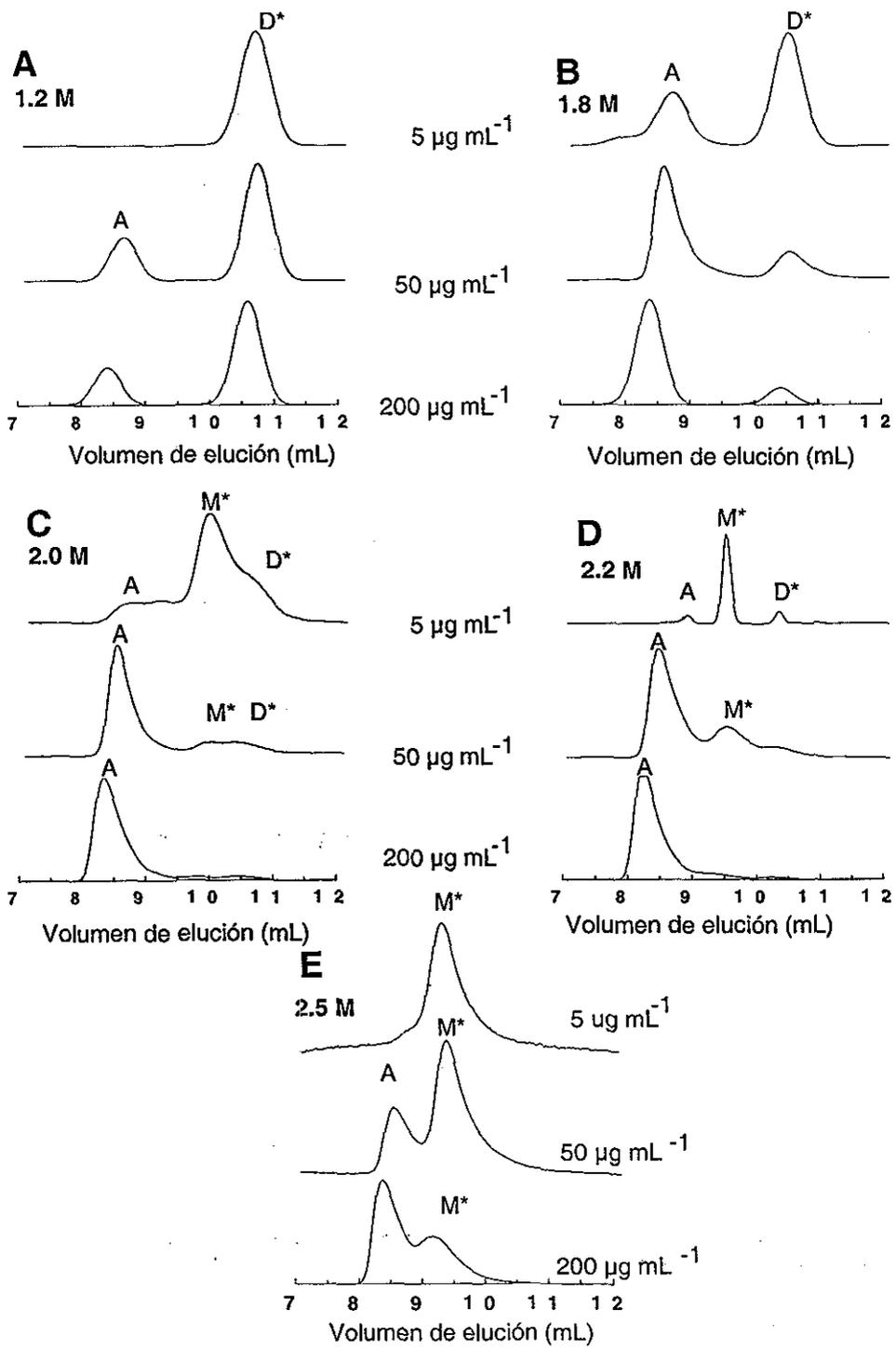
Para corroborar el estado de asociación propuesto para D^* , M^* y A se siguió el efecto de la concentración de proteína en el equilibrio D^* a M^* por CEM-FPLC. Se eligieron concentraciones de desnaturizante donde se observó más de una especie: 1.2, 1.8, 2.0, 2.2 y 2.5 M de GdnHCl. Las concentraciones de TbtTIM utilizadas fueron de 5 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La Figura 20 muestra los resultados obtenidos.

En concentraciones de GdnHCl de 1.2 y 1.8 M (Figura 20 recuadros A y B) D^* es el estado dominante a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cuando la concentración de proteína se aumenta a 50 o 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se favorece la presencia de A . El estado M^* es el estado más favorecido a 2.0, 2.2 y 2.5 M de GdnHCl y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (recuadros C, D y E). En todas las concentraciones de GdnHCl observadas, el agregado A , se incrementa conforme aumenta la concentración de proteína de 5 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Conforme A aumenta, D^* y M^* disminuyen.

Si efectivamente M^* es un intermediario monomérico, se esperaría que al disminuir la concentración de proteína a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ M^* fuera predominante y que al aumentar la concentración a 50 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se viera menos representado. Esto es lo que podemos observar en los paneles C, D y E de la figura 20.

Página siguiente

Figura 20. Efecto de la concentración de proteína en el equilibrio de los estados D^ , A y M^* . Los perfiles de elución de las muestras incubadas al tiempo de equilibrio a 5, 50 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TbtTIM a diferentes concentraciones de GdnHCl. Los recuadros A a E se obtuvieron a 1.2, 1.8, 2.0, 2.2 y 2.5 M de GdnHCl.*



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla V. Valores de $C_{1/2}$ para actividad catalítica (Fig. 15), fluorescencia intrínseca (Fig. 16 A y B), y DC (Fig. 13) calculados con el programa Savuka, versión 5.12 (Bilsel et al., 1998).

Técnicas	$D \rightleftharpoons D^*$ [GdnHCl] _{1/2}		$D^* \rightleftharpoons 2U$ [GdnHCl] _{1/2}	
Actividad [GdnHCl] _{1/2} ^a	wt	1.08	No detectable	
	W12F	0.82		
	W12F/W193F	0.75		
DC [GdnHCl] _{1/2} ^a	wt	1.0	wt	2.14
	W12F	0.8	W12F	2.43
	W12F/W193F	0.65	W12F/W193F	2.19
SCM [GdnHCl] _{1/2} ^a	wt	1.2	wt	2.2
	W12F	0.9	W12F	2.16
	W12F/W193F	0.7	W12F/W193F	2.22
Intensidad de fluorescencia a λ_{max} [GdnHCl] _{1/2} ^a	wt	1.2	wt	2.2
	W12F	no detectado	W12F	2.0
	W12F/W193F	0.69	W12F/W193F	2.2
	$D \rightleftharpoons D^*$		$D^* \rightleftharpoons 2M^*$	$2M^* \rightleftharpoons 2U$
SEC-FPLC ^b	wt 0- 1.8 M		wt 2.0- 2.2 M	wt 2.2- 6.0 M

^a Valores de $C_{1/2}$ (M) para actividad catalítica (Fig. 15), fluorescencia intrínseca (Figs. 16), y DC (Fig. 13). Estos valores fueron calculados utilizando el programa Savuka, versión 5.12 (Bilsel et al., 1998).

^b Los intervalos de concentración se obtuvieron de los datos de la figura 19.

4. Discusión

4.1 Caracterización de la TbTIM y las mutantes construidas y estabilidad a la dilución.

En el presente trabajo se construyeron las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F sobre el gen de la TIM de *Trypanosoma brucei*. Los genes con las correspondientes sustituciones de W por F se insertaron en un plásmido con el que se transformó una cepa de expresión que nos permitió sobreexpresar y purificar a las enzimas. La caracterización de la TbTIM y las mutantes construidas y purificadas en este trabajo, mostró que la W12F, W159F y la W12F/W193F poseen parámetros cinéticos y espectroscópicos semejantes a los de la TbTIM silvestre (Tabla I) por lo que suponemos que los residuos involucrados en la catálisis no están afectados considerablemente como resultado de las mutaciones. Los parámetros espectrales ($\lambda_{\text{máx}}$ y SCM) de las mutantes son semejantes a los obtenidos para la proteína silvestre, lo que sugiere que los W restantes no se han expuesto al solvente como resultado de la alteración de los residuos sustituidos.

Las mutantes W12F y W12F/W193F son menos estables a la dilución que la proteína silvestre (Fig. 4). En general, la TbTIM es una proteína muy inestable a la dilución. Si la comparamos con los resultados obtenidos para la TIM de levadura (γ TIM) (Nájera-Peña *et al.*, en preparación) y de amiba (Landa *et al.*, 1997) que son estables hasta a una concentración de 2.0 y 0.4 ng mL⁻¹ respectivamente, la TbTIM es muy inestable, al igual que la TIM de *T. cruzi* que sólo es estable en concentraciones por arriba de 1 μ g mL⁻¹ (Gómez-Puyou *et al.*, comunicación personal).

La diferencia en la estabilidad a la dilución puede explicarse en términos de qué tan fuerte es la interacción entre los dímeros, esto es, en términos de la diferencia en energía libre entre el dímero y los monómeros aislados. La secuencia y estructura tridimensional de

las TIMs es muy parecida en las diferentes especies, por lo que se esperaría que los contactos entre monómeros estuvieran altamente conservados. A pesar de esto, el análisis de los residuos involucrados en las interacciones de la interfase del dímero de las TIMs de levadura y tripanosoma muestran gran variabilidad. La identidad de la secuencia entre los 32 residuos de la interfase de la TbTIM y la yTIM es del 59 % entre estas dos especies. Sin embargo a pesar de esta variación, la manera en que los monómeros se asocian no cambia significativamente.

Los puentes de hidrógeno que se forman entre residuos de la subunidad 1 y la 2 están muy conservados, y hay 21 para pollo, 24 para levadura y 20 para tripanosoma. Sin embargo, las interacciones del asa 2 de la TbTIM y la yTIM son diferentes. En el caso de la TbTIM, la V46 se encuentra en la punta del asa 2, y cuando los monómeros se encuentran separados, este residuo queda prácticamente expuesto. Cuando el dímero está formado, la V46 se encuentra rodeada por residuos hidrofóbicos (F345, L348, V378, I382, L383 y F386). En la yTIM, esta V está sustituida por la T45, que participa en puentes de hidrógeno mediados por agua con la otra subunidad, por lo tanto, las interacciones hidrofóbicas en la interfase de la TbTIM tienen como contraparte interacciones polares en la yTIM (Wierenga & Noble, 1992).

4.2 Determinación del grado de reversibilidad en el proceso de desplegamiento de la TbTIM

Los estudios de plegamiento de proteínas involucran la caracterización cinética y/o termodinámica de los estados nativo y desplegado así como de los intermediarios. Las transiciones de desplegamiento de las proteínas se presentan al aumentar la concentración de un agente químico como urea o GdnHCl, o al modificar una propiedad del solvente

como presión o temperatura, entre otros. Esto tiene el objetivo de caracterizar los estados presentes a lo largo de la desnaturalización de las proteínas, e idealmente, calcular la estabilidad conformacional de las mismas. Para caracterizar el plegamiento de las proteínas en términos termodinámicos, es necesario que el proceso de desnaturalización se encuentre en condiciones de equilibrio. Por otro lado, la reversibilidad del proceso es un requisito indispensable para que el análisis termodinámico sea válido.

Para la TbTIM y las mutantes W12F y W12F/W193F se determinaron las condiciones de "equilibrio" (ver más adelante) para urea y GdnHCl. El seguimiento de los espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína a diferentes concentraciones de los dos desnaturalizantes a lo largo del tiempo, indicó que las señales permanecen estables a las 200 horas al ser incubadas con urea y a 48 horas al incubarse en GdnHCl. El seguimiento del desplegamiento de la TbTIM a diferentes concentraciones de ambos desnaturalizantes se hizo incubando las muestras a esos tiempos para urea o GdnHCl.

Por otro lado, la reversibilidad del proceso era otro de los puntos a caracterizar para continuar con el objetivo de estudiar el patrón de plegamiento de la TbTIM. Muchos de los estudios de plegamiento de proteínas se han realizado preferencialmente con proteínas monoméricas, debido a que las proteínas oligoméricas generalmente tienen procesos de desplegamiento más complejos en los que muchas veces existe agregación provocando irreversibilidad parcial o total del proceso. La reversibilidad de la desnaturalización por urea y GdnHCl se siguió para la TbTIM y la mutante W12F/W193F. Con ninguno de los dos desnaturalizantes el proceso es totalmente reversible.

En el caso de urea se observa irreversibilidad del proceso a concentraciones entre 1.5 y 7.0 M de urea, aunque entre 0 y 1.0 M hay un 80% de reversibilidad. Ningún efecto en la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

recuperación de las señales se observó para el repliegamiento a diferentes concentraciones de proteína (Figuras 5 y 6).

Para la desnaturalización con GdnHCl la recuperación de la actividad catalítica y la λ_{max} de la proteína nativa (322 nm) dependen tanto de la concentración de desnaturalizante usada durante la incubación al tiempo de equilibrio, como de la concentración de proteína utilizada durante la renaturalización (Figuras 7 y 8).

La irreversibilidad parcial o total del proceso de desplegamiento se debe muchas veces a la precipitación o la agregación de la proteína. Las reacciones de agregación se incrementan a mayor concentración de proteína. En el caso de urea, no se observa claramente un efecto de la concentración de proteína, ni la caracterización de la enzima llegó a tal punto que se haya podido observar la presencia de agregados durante el proceso. Por otro lado, para GdnHCl el incremento en la concentración de proteína de 2 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ muestra claramente que a mayor concentración de proteína menor porcentaje de renaturalización, lo que sugiere que la agregación tiene lugar en la desnaturalización con GdnHCl. Para este desnaturalizante, los experimentos de CEM-FPLC (ver más adelante) muestran claramente que a las concentraciones de proteína donde no se observa ninguna recuperación de las propiedades de la proteína nativa, existe la formación de especies de alto peso molecular que eluyen en el límite máximo de resolución de la columna y que caracterizamos como agregados en el proceso de desnaturalización por GdnHCl (Fig 18 pico A y 19 *). Estos mismos experimentos mostraron cómo la formación de agregado se favorece conforme se incrementa la concentración de proteína de 5 a 50 y a 200 $\mu\text{g TIM mL}^{-1}$ (Figura 20 A-E).

Como se discutirá más adelante, es muy probable que la formación de los intermediarios D^* y M^* observados en la desnaturalización por $GdnHCl$, sigan rutas irreversibles hacia la formación de agregados. Aunque la desnaturalización con urea no se caracterizó hasta el punto de poder observar los agregados por FPLC es muy probable que el mismo fenómeno ocasione la irreversibilidad del proceso.

La agregación de la TbtTIM y la consecuente irreversibilidad del proceso de desplegamiento tienen repercusiones importantes en este trabajo, ya que impiden la caracterización termodinámica del proceso. Como un primer punto, está la imposibilidad de determinar las condiciones de equilibrio. Un dato que siempre ha causado incomodidad en quienes han revisado los resultados de este trabajo es que el tiempo de incubación en urea sea de 200 horas. Incluso 48 horas para $GdnHCl$ siempre ha parecido un tiempo muy largo. De hecho, la irreversibilidad se ha atribuido a la duración del tiempo de incubación. 200 horas de incubación para urea y 48 horas para $GdnHCl$, son sin embargo, los tiempos donde ya no se observa ningún cambio en las señales. El patrón de desnaturalización para ambos desnaturalizantes con la TbtTIM y las mutantes incubadas a ese tiempo de incubación son los resultados mostrados a lo largo de la sección de resultados de esta tesis.

Para saber si la degradación química resultado de los largos tiempos de incubación en urea era responsable de la irreversibilidad, se determinó la actividad catalítica de las muestras incubadas en urea por períodos cortos de tiempo de entre 3 y 24 horas, observándose un bajo nivel de recuperación de la actividad catalítica, que era independiente de los tiempos de incubación. Esto nos sugería que la irreversibilidad se debe a un plegamiento inadecuado y a una asociación incorrecta de la TbtTIM donde la agregación es un proceso que no puede descartarse, más que degradación química por la incubación en urea a tiempos largos.

En el caso de GdnHCl, se cuantificó el porcentaje de renaturalización (24 horas después de diluir el desnaturalizante) al incubar a diferentes concentraciones de GdnHCl por 2, 24 y 48 horas. A las 2 horas, el porcentaje de renaturalización es considerablemente mayor que a 24 horas y más aún que a 48 horas de incubación. Sin embargo, el patrón de desnaturalización obtenido incubando a 2 y 24 horas es diferente al reportado en este trabajo incubando durante 48 horas. Esto se debe a que la proteína no se ha desnaturalizado en este tiempo.

Este resultado tiene implicaciones importantes. El objetivo de este trabajo era analizar los resultados desde el punto de vista termodinámico, no cinético. Para lo cual era necesario obtener el tiempo en el cual el proceso ya no cambia a lo largo del tiempo. Incubar por este intervalo nos permite obtener un patrón de desnaturalización lo más cercano posible a las condiciones de equilibrio. El patrón de desnaturalización obtenido entre 2 y 24 horas es diferente para cada tiempo ya que la proteína sigue desnaturalizándose todavía a esos tiempos. Sin embargo, hacer los experimentos al tiempo al cual consideramos se está cerca de las condiciones de equilibrio, en nuestro caso tiene el costo de la irreversibilidad del proceso. Esto nos indica que a lo largo del tiempo se forma una especie de la cual era imposible obtener de nuevo a la proteína nativa. Por supuesto, esta especie se seguía formando con el paso de las horas. La formación de agregados es la explicación a esta irreversibilidad. Por CEM-FPLC se pudo identificar la presencia de agregados al desnaturalizar a la TbTIM con GdnHCl, lo que apoya nuestra suposición. Por lo tanto, la irreversibilidad del proceso (al menos comprobado en GdnHCl) se debe a la formación de agregados.

El camino de formación de agregados es irreversible, por lo que a lo largo del tiempo, las moléculas que se encuentran en **D**, **D***, **M*** y **U** (ver más adelante) eventualmente

formarían agregados, por lo que el verdadero tiempo de equilibrio para TbTIM en GdnHCl correspondería al tiempo en el cual toda la proteína está agregada. Con esto llegamos a la conclusión de que nuestros experimentos, aunque no muestran variación a lo largo del tiempo entre 36 y 200 horas, seguramente mostrarían una variación considerable al volver a medirlos a tiempos considerablemente más largos.

Por otro lado, es posible tener un mayor porcentaje de reversibilidad a tiempos cortos, a costa de no observar la presencia de intermediarios estables durante el proceso.

La irreversibilidad en el desplegamiento de la TIM también se ha observado para el desplegamiento con GdnHCl de la TIM de *Plasmodium falciparum* (Gokhale *et al.*, 1999), la desnaturalización térmica y por GdnHCl de *Thermotoga maritima* (Beaucamp *et al.*, 1997), la proteína silvestre y mutantes monoméricas de la TbTIM (Schliebs *et al.*, 1997). Recientemente, los resultados obtenidos para la desnaturalización térmica de la yTIM muestran que la agregación es un proceso probable cuando se intenta seguir la transición al equilibrio que provoca irreversibilidad del proceso. Sin embargo el uso de bajas concentraciones de proteína y de velocidades de barrido mayores a $1.0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ permitió encontrar condiciones de reversibilidad para el estudio de esta enzima (Benítez-Cardoza *et al.*, 2001).

4.3 Desplegamiento de TbTIM, W12F y W12F/W193F inducido por urea.

El desplegamiento de la TbTIM y de las mutantes W12F y W12F/W193F inducido por urea se siguió por DC, actividad catalítica, fluorescencia intrínseca y unión de ANS. Los datos obtenidos con las técnicas espectroscópicas, muestran que el patrón de desnaturalización no es monofásico mostrando dos transiciones con una meseta entre 2.0 y 5.0 M de urea (Figs. 9 y 12). Los datos obtenidos por actividad catalítica (Fig. 11) muestran

que ésta se pierde durante la primera transición. La presencia de esta plataforma observada por IF y CD indica que el patrón de desnaturalización no es de dos estados, y que existe por lo menos un intermediario cuya presencia es evidente entre 2.0 y 5.0 M de urea.

Para todas las señales, incluyendo la unión de ANS, se observa claramente que la W12F/W193F se vuelve más sensible al desnaturalizante que la W12F y la proteína silvestre. Los valores de $C_{1/2}$ de la primera transición medida por DC, fluorescencia y actividad catalítica muestran que el dímero nativo está desestabilizado en las mutantes con respecto a la proteína silvestre (Tabla IV). El pico de aumento de fluorescencia del ANS para la TbTIM y las mutantes incubadas a diferentes concentraciones de urea (Fig. 10) coincide con el rango de concentraciones donde se observó la meseta por DC, fluorescencia y SCM, así como la pérdida de la actividad (entre 2.0 y 5.5 M de urea para la TbTIM). Coincidentemente con la disminución de la $C_{1/2}$ para estas señales, el incremento en la fluorescencia del ANS se da en un rango de concentraciones más amplio para la W12F/W193F, W12F y TbTIM silvestre. Esto nos indica que entre 2.0 y 5.0 M de ANS, existe por lo menos un intermediario en el patrón de desplegamiento de la enzima. Para las tres enzimas, el pico de aumento en la fluorescencia del ANS no es un pico simétrico. En el caso de TbTIM y W12F/W193F este pico tiene un hombro que nos sugiere que podrían existir dos intermediarios en realidad entre 2.0 y 5.0 M de urea (Fig. 10).

Este comportamiento ha sido descrito para la anhidrasa carbónica B, para la cual se había descrito un comportamiento de tres estados con un intermediario glóbulo fundido (Semisotnov, 1987., Semisotnov, 1991., Uversky, 1993). Sin embargo el pico de máxima fluorescencia del ANS no era perfectamente simétrico y la desconvolución de este pico mostró que existía en realidad otro intermediario, que fue caracterizado posteriormente por CEM-FPLC a baja temperatura (Uversky & Ptitsyn, 1996).

La desconvolución del pico de fluorescencia de ANS para la TbTIM indica que éste se compone de dos picos con un máximo de fluorescencia a concentraciones de urea de 3.5 y 5.0 M. Para W12F las concentraciones son 2.7 y 3.9 M, y para W12F/W193F, en la cual el pico está claramente formado por dos poblaciones, las concentraciones son 3.0 y 4.5 M de urea. Sin embargo los resultados anteriores sólo nos permiten decir que para la TbTIM y las mutantes W12F y W12F/W193F el patrón de desnaturalización no es monofásico, con una meseta identificada por DC, fluorescencia y SCM a concentraciones entre 2.0 y 5.0 M de urea, donde el incremento en la fluorescencia del ANS indica que existe por lo menos una especie parcialmente desplegada (50 % de la estructura secundaria de las proteínas nativas, ha perdido una tercera parte de la fluorescencia original y sin actividad catalítica).

Con esta información no es posible determinar si hay uno o dos intermediarios en la región de la meseta, ni tampoco cuál es su estado de asociación, por lo que una caracterización de las propiedades hidrodinámicas de la enzima a todas las concentraciones de urea utilizadas es necesaria para proponer un patrón de desplegamiento de la TbTIM en este desnaturalizante.

Por otro lado, la comparación de la intensidad de fluorescencia de la TbTIM y las mutantes con residuos W sustituidos con F nos permitió obtener una propuesta de las regiones que se exponen a lo largo del incremento en las condiciones desnaturalizantes, que se discutirá más adelante junto con los datos obtenidos por esta misma técnica para GdnHCl.

4.4 Desplegamiento de TbTIM, W12F y W12F/W193F inducido por GdnHCl.

El desplegamiento por GdnHCl de la TbTIM silvestre seguido por DC e IF no es monofásico. Tiene dos transiciones detectables cuyos valores de $C_{1/2}$ están a concentraciones entre 1.0 y 1.2 M de GdnHCl para la primera transición y entre 2.1 y 2.2 M

para la segunda transición. La actividad catalítica se pierde durante la primera transición (Fig. 15 Tabla V)

En las mutantes W12F y W12F/W193F el punto de inflexión es más acentuado en la proteína silvestre, observándose una meseta evidente entre 1.0 y 2.0 M GdnHCl. En las mutantes, los valores de $C_{1/2}$ para la segunda transición se encuentran entre 2.0 y 2.4 M GdnHCl, es decir son muy similares al $C_{1/2}$ de la proteína silvestre. Por otro lado, la primera transición disminuye su valor de $C_{1/2}$ en el orden TbTIM>W12F>W12F/W193F (Tabla V). Este comportamiento se observa por DC, IF y actividad catalítica. La disminución de los valores de $C_{1/2}$ para la primera transición sugiere que la forma nativa de las dos mutantes está desestabilizada, haciéndola más susceptible de la acción del desnaturizante, y permitiendo que el o los intermediarios se observen. Esta región que sugiere la presencia de por lo menos un intermediario no presenta actividad catalítica.

La unión y fluorescencia de ANS se observó en intervalos de concentración de desnaturizante aumentándose en el orden TbTIM <W12F <W12F/W193F. Por otro lado, la mutante W12F/W193F presenta una mayor intensidad de fluorescencia del ANS que la W12F y la proteína silvestre. La unión de ANS apoya la hipótesis de la presencia de por lo menos un intermediario entre 1.0 y 2.0 M de GdnHCl. Sin embargo, a partir de estos datos no era posible proponer el estado de asociación de un posible intermediario por lo que se decidió realizar experimentos de cromatografía de exclusión molecular (CEM-FPLC) que se discuten a continuación.

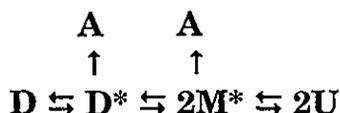
4.5 Obtención del patrón de desnaturalización para la TbTIM por CEM-FPLC

La caracterización de la TbTIM silvestre, desnaturalizada con GdnHCl se hizo también por CEM-FPLC en una columna calibrada en condiciones nativas y desnaturalizantes (GdnHCl 6.0 M) con base en la calibración hecha por Uversky (Uversky *et al.*, 1993).

Los perfiles cromatográficos de la TbTIM muestran que a concentraciones entre 0.1 y 0.9 M así como entre 3.0 y 6.0 M de GdnHCl existe un solo pico de elución (Fig. 18 y valores correspondientes en R_s en Fig. 19). En ambos intervalos este pico no tiene un volumen de elución constante, sino que eluyen a volúmenes menores al aumentar la concentración de GdnHCl. Este comportamiento se observa cuando dos especies mayoritarias presentan una interconversión rápida (mayor a segundos). En estos casos no se pueden observar picos con volúmenes de elución diferentes, y se observa un "pico promedio".

La comparación de las propiedades hidrodinámicas de la TbTIM y la mutante monomérica RM00-1TIM (Saab *et al.*, 2001) nos permitieron sugerir el estado de asociación de las especies entre 1.0 y 2.5 M de GdnHCl. En el caso de la RM00-1TIM se observa una sola transición.

La cromatografía de exclusión molecular nos permitió observar dos intermediarios en el desplegamiento de la TbTIM. El modelo propuesto para este proceso es:



La primera transición observada por DC, IF y actividad catalítica se observa a concentraciones entre 0.1 y 1.8 M de GdnHCl. Los datos de CEM-FPLC indican que el cambio correspondiente en el radio de Stokes para la TbTIM es de 29.6 Å a 32.0 Å en este intervalo. Este cambio en el valor de R_s involucra la presencia de un intermediario, y por la diferencia en valores de R_s con la RM00-1TIM a estas mismas concentraciones de desnaturante, proponemos que este intermediario es un intermediario dimérico (D^*). Los datos espectroscópicos indican que la formación de D^* está acompañada de una reducción del 50 % de la estructura secundaria (α hélice), un cambio de 10 nm en el SCM, la pérdida de la actividad catalítica y una exposición de regiones hidrofóbicas al solvente (Comparar Fig. 19(•) con Figs 13-15, 16 A y B).

A concentraciones entre 1.0 y 2.5 M GdnHCl, D^* coexiste con dos especies llamadas A y M^* . Estas especies son muy diferentes en sus características hidrodinámicas comparadas con D^* . Para el caso de A, el valor de R_s es en promedio de 46.7 Å (Fig.19*). Este valor es mayor que el R_s obtenido para los monómeros desnaturados de la TbTIM y la RMOO-1TIM por lo que es muy probable que A esté formado por moléculas agregadas (ver más adelante). Por otro lado, la especie denominada M^* (Fig. 19 ■) sólo se observa coexistiendo con D^* a 2.0 y 2.2 M de GdnHCl. La comparación con los valores de R_s de M^* , indica que éstos se sobreponen con los obtenidos para la RM00-1TIM entre 1.8 M y 6.0 M de GdnHCl. (Fig.19 ■,◇) por lo que proponemos que M^* es un intermediario monomérico.

Entre 2.0 y 2.2 M, M^* y D^* coexisten en un intercambio suficientemente lento como para poderse observar por la cromatografía. Sin embargo a 1.8 M se observa un sólo pico por esta técnica. La sobreposición de los perfiles de elución de RM00-1TIM y TbTIM a 1.8 M GdnHCl (datos no mostrados) indica que el pico correspondiente a la mutante se encuentra dentro del pico obtenido para la TbTIM, sin embargo, este último es más ancho,

sugiriendo la presencia de otra especie. En este caso particular, la presencia de un sólo pico puede deberse a que M^* a 1.8 M de GdnHCl tiene un R_s muy similar a D^* . M^* es tan expandido que es prácticamente del tamaño de D^* .

M^* se sigue expandiendo entre 2.5 y hasta 6.0 M de desnaturizante (Fig. 19 ■). Como podemos observar, tanto la transición de D^* a $2M^*$ como de $2M^*$ a $2U$ ocurren en el mismo intervalo de concentraciones donde se observa la segunda transición por las técnicas espectroscópicas ($C_{1/2} = 2.1-2.2$ M). Sin embargo, los dos eventos que ocurren en estas concentraciones de GdnHCl sólo se pueden observar por cromatografía, por lo que la segunda transición observada por técnicas espectroscópicas en realidad sólo puede sentir el cambio D^* a $2U$, que involucra la pérdida total de estructura secundaria y terciaria (Tabla V y Figs. 13 y 16).

En resumen, para la desnaturalización con GdnHCl los datos de actividad catalítica muestran una sola transición ya que la actividad es cero concentraciones entre 1.0 y 2.0 M de GdnHCl (Fig. 15). A estas mismas concentraciones de desnaturizante, por aumento de la fluorescencia del ANS se observa que existe por lo menos un intermediario inactivo. Los resultados de fluorescencia, SCM y CD muestran que hay dos transiciones detectables. Los datos de FPLC muestran que la primera transición detectada por fluorescencia, SCM, DC y actividad catalítica corresponden a la expansión de D a D^* (29.6 Å a 32.0 Å) entre 0.1 y 1.8 M GdnHCl. La segunda transición observada por DC, fluorescencia y SCM involucra dos eventos: D^* a $2M^*$ y $2M^*$ a $2U$. Ninguna otra técnica utilizada permitió aislar a los dos intermediarios de la segunda transición, excepto CEM-FPLC.

Por otro lado, la existencia de agregados y la dependencia con la concentración de proteína entre 1.0 y 2.5 M de GdnHCl, explica la irreversibilidad total del proceso a estas concentraciones de desnaturizante. Los agregados (A) detectados por FPLC se observan

entre 1.0 y 2.5 M de GdnHCl. El pico correspondiente a D* disminuye, mientras que el de A aumenta conforme se incrementa la concentración de proteína (Fig 20. A y B), sugiriendo que A se forma cuando D* y/o M* siguen una ruta no productiva e irreversible hacia A. La presencia de estos agregados coincide, como era de esperarse, con la falta de recuperación de las características nativas de la enzima a las mismas concentraciones de desnaturizante en el experimento de renaturalización (comparar Fig. 7 y 19). La comparación de estas las figuras 7 y 18 nos permite observar que a concentraciones entre 1.0 y 2.0 M de GdnHCl durante la incubación y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TbTIM, no hay ningún porcentaje de reversibilidad. Sin embargo, en estas mismas condiciones, el cromatograma indica que la población mayoritaria es D*(Fig. 18). Esto nos sugiere, que aunque evidentemente la incubación por 48 horas a estas concentraciones de GdnHCl provoca la formación de agregados, la irreversibilidad observada en la Fig. 7 se debe principalmente a la agregación causada por la incubación a altas concentraciones de proteína para el ensayo de reversibilidad (ver Material y Métodos).

4.6 Dilucidación del patrón de desnaturalización de la TbTIM por fluorescencia intrínseca utilizando las mutantes W12F y W12F/W193F

Los espectros de emisión de fluorescencia de la TbTIM, W12F y W12F/W193F (Fig. 3B) muestran que la $\lambda_{\text{máx}}$ para las tres enzimas es de 322 nm (excitación 295 nm). La intensidad de fluorescencia de las enzimas indica que la W12F disminuye su fluorescencia en un 40 % con respecto a la proteína silvestre. Esto era de esperarse ya que el W12 es un residuo totalmente oculto al solvente (Tabla II), y seguramente es el que más contribuye a la intensidad de fluorescencia de la enzima. Sin embargo, la señal de IF de W12F/W193F

sólo disminuye un 20 % con respecto a la TbTIM silvestre. Este resultado sugiere que el W193, apaga la fluorescencia de otro W presente tanto en la TbTIM como en W12F. Para poder apagar la fluorescencia de un W cercano, el W193 tendría que tener cerca a otro W. Por otro lado, este mismo W193 tendría que ser un residuo expuesto al solvente de tal manera que la fluorescencia de éste se disipara en el medio. Las tablas II y III muestran que el W193 es el W más expuesto al solvente, y que la distancia menor entre W193 y otro W es para el par W193- W159 con una distancia de 6.2 Å. Esto indica que la fluorescencia del W159 se apaga por el W193 y esto se corrobora con la comparación de los espectros de emisión de la mutante W159F y TbTIM, donde se esperaba que la intensidad de fluorescencia de ambas enzimas tuviera un valor similar (Fig. 3B).

De los cinco residuos W de la TbTIM (Fig. 2), el W90 y el W193 se encuentran expuestos al solvente (Tabla II), lo que sugiere que los residuos cuya exposición al solvente producen los mayores cambios en fluorescencia a lo largo del desplegamiento son el W12, W159 y W170.

En el caso de la TbTIM, los cambios en fluorescencia se deben principalmente al W12 y al W170, ya que es muy probable que el W159 se encuentre apagado por el W193. Siguiendo el mismo razonamiento, la mutante W12F reflejaría principalmente los cambios del W170, ya que se sustituyó el W12 por un residuo menos fluorescente. Por otra parte, los cambios en fluorescencia de la doble mutante W12F/W193F se deben principalmente a la exposición de W170 y W159.

Durante el desplegamiento de la W12F, los cambios en fluorescencia, que muestran principalmente la exposición de W170, se observan entre 4.0 y 6.0 M de urea (Fig. 12 B), y entre 1.4 y 3.0 M de GdnHCl (Fig. 16 B), indicando que a estas concentraciones de desnaturizante, el asa catalítica donde se encuentra el W170 se expone al solvente. En el

caso de la desnaturalización con GdnHCl este cambio en fluorescencia por el W170 puede correlacionarse con la transición $2M^* \rightleftharpoons 2U$.

La desnaturalización de la TbTIM muestra dos claras transiciones tanto en urea como en GdnHCl. En urea la primera transición tiene un valor de $C_{1/2}$ de aproximadamente 2.8 M y la segunda de 5.5 M. En el caso de GdnHCl, la primera transición tiene un valor de $C_{1/2}$ cerca de 1.2 M GdnHCl y la segunda de 2.2 M de GdnHCl. En estas dos transiciones, los cambios en la intensidad de fluorescencia se deben al W12 o al W170 o bien, a ambos.

La diferencia en fluorescencia entre W12F y TbTIM es la exposición del W12 en esta última. La comparación de los patrones de desnaturalización de estas dos enzimas tanto en urea como en GdnHCl muestran que la TbTIM presenta una transición a bajas concentraciones de desnaturalizante (entre 1.0 y 2.0 M GdnHCl y entre 0 y 2.2 M urea) que no se observa para la W12F. Esto sugiere que el residuo de la interfase W12, queda expuesto al solvente bajo estas concentraciones de desnaturalizante y antes que el W170 (ver arriba). Para la desnaturalización con GdnHCl este evento corresponde a la transición $D \rightleftharpoons D^*$ (Tabla V).

Por último, la W12F/W193F muestra dos transiciones para ambos desnaturalizantes que reflejan principalmente la exposición del W159 y del W170. La segunda transición observada también en W12F y TbTIM muestra la exposición del W170. Por lo tanto, la transición observada para W12F/W193F a bajas concentraciones de desnaturalizante (0 a 1.0 M GdnHCl, y entre 0 y 2.0 M urea), muestra principalmente la exposición del W159 localizado en la hélice 3_{10} (antes de la hebra β 6). La exposición del W159 en GdnHCl corresponde a la transición $D \rightleftharpoons D^*$ (Tabla V).

En resumen, todos estos datos indican que hay una exposición gradual de los residuos W del barril de la TIM. La secuencia propuesta a partir del análisis de estos resultados es que la primera transición observada por intensidad de fluorescencia intrínseca a concentraciones entre 0 y 2.0 M de urea, así como a concentraciones entre 0 y 1.0 M de GdnHCl, es el resultado de la exposición del W12 (comparar patrones de TbTIM y W12F (Figuras 12B para urea y 16B para GdnHCl), y del W159, es decir de hélice 3_{10} cerca de la hebra β 6 (observar datos para W12F/W193F, donde el W159 no está apagado y comparar con los de TbTIM). La segunda transición para TbTIM y W12F/W193F se observa entre 2.0 y 5.0 M de urea y entre 1.0 y 3.0 M GdnHCl, y corresponde a la exposición del asa catalítica donde se encuentra localizado el W170. Esta observación se obtiene del análisis de los datos de la W12F (ver arriba).

4.7 Plegamiento de diferentes TIMs y la hipótesis de la conservación del plegamiento de proteínas homólogas

Dentro del problema del plegamiento de las proteínas, algunos grupos han propuesto que la ruta de plegamiento de las proteínas está conservada a lo largo de la evolución. Esta propuesta dice que proteínas homólogas siguen la misma ruta de plegamiento para asegurar que las proteínas se plieguen rápidamente (Hollecker & Creighton, 1983, Krebs *et al.*, 1983). Esta hipótesis se ha apoyado en un buen número de casos de proteínas homólogas. La desnaturalización y renaturalización tanto en estudios cinéticos como termodinámicos de la subunidad α de la triptofano sintasa de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* y de 5 interespecies híbridas (Stackhouse *et al.*, 1988), la proteína acil-coenzima A de bovino, rata y levadura (Kragelund *et al.*, 1996), las ribonucleasas de diferentes especies (Krebs *et al.*,

1985), la acilfosfatasa de “tipo común” y de músculo (Taddei *et al.*, 1999), las proteínas de choque al frío CspB de *Bacillus subtilis*, *B. caldolyticus* y *Thermotoga maritima* (Perl *et al.*, 1998) y las proteínas Im7 e Im9 (Ferguson *et al.*, 1999) son ejemplos que muestran que en condiciones de equilibrio, el patrón de desnaturalización de dos estados (o de tres estados en el caso de la subunidad α de la triptofano sintasa) se conserva en cada familia de proteínas.

En la mayoría de los casos, los estudios cinéticos de desplegamiento de estas enzimas muestran que el esquema fundamental de plegamiento es similar pero existen diferencias en las constantes de velocidad. Todos estos ejemplos indican que aparentemente, las proteínas siguen fundamentalmente el mismo proceso de plegamiento, el cual está conservado a lo largo de la evolución apoyando la hipótesis de la conservación del plegamiento.

Sin embargo, también existen algunas evidencias de un diferente patrón de plegamiento para proteínas homólogas. En el caso de las proteínas Im7 e Im9 en los que los resultados al equilibrio muestran un proceso similar, el análisis cinético muestra que la Im9 sigue un patrón de dos estados mientras que la Im7 presenta uno de 3 estados con un intermediario con mayor intensidad de fluorescencia (Ferguson *et al.*, 1999). En el caso de otro par de proteínas homólogas, las estefinas A y B, tanto los datos cinéticos como termodinámicos muestran que hay muchas diferencias en estabilidad bajo diferentes condiciones desnaturalizantes como cambio en pH, desnaturalización térmica y GdnHCl. La estefina A muestra un patrón de dos estados, mientras que la estefina B presenta un intermediario semejante a un glóbulo fundido (Zerovnik *et al.*, 1991a, 1991b, 1992, 1997, 1998).

Resulta interesante seguir no sólo a una familia de proteínas sino a la misma enzima de diferentes especies. La estructura terciaria y cuaternaria de la TIM de varias especies es

prácticamente idéntica (Wierenga & Noble, 1992, Maldonado *et al.*, 1998) lo que la vuelve una proteína interesante para comparar si se conserva el patrón de plegamiento. Por otro lado, la comparación de los patrones de desnaturalización de las TIMs de diferentes especies permite determinar las características comunes en la desnaturalización de esta proteína.

La cinética de renaturalización de la TIM de conejo (Waley, 1973., Zabori *et al.*, 1980) muestra la presencia de un intermediario transitorio. Los estudios al equilibrio han reportado un patrón de desnaturalización de dos estados. La desnaturalización al equilibrio de la TIM de humano (Mainfroid *et al.*, 1996 a), *Plasmodium falciparum* (Gokhale *et al.*, 1999) y de levadura (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000) inducida por urea, así como el desplegamiento de la TIM de *Leishmania mexicana* (LmTIM) (Lambeir *et al.*, 2000) en GdnHCl, muestran una transición de dos estados. Sin embargo la desnaturalización inducida por GdnHCl para *Plasmodium falciparum* (Gokhale *et al.*, 1999), yTIM (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000, Morgan *et al.*, 2000) y LmTIM (Lambeir *et al.*, 2000) con cambios de pH, señala la presencia de intermediarios en el proceso. En el caso de *Plasmodium falciparum* el intermediario no se caracterizó totalmente y los autores se limitaron a proponerlo como un agregado.

Para la yTIM desnaturalizada con GdnHCl, Vázquez-Contreras *et al.* y Morgan *et al.* observan un patrón de desnaturalización monofásico en el que sin embargo, se encuentra un intermediario que fue caracterizado por diferentes técnicas como un intermediario monomérico (Vázquez-Contreras *et al.*, 2000, Morgan *et al.*, 2000). En contraste, la desnaturalización térmica de esta misma enzima sugiere que la yTIM se dimeriza de manera acoplada al replegamiento de la enzima. (Benítez-Cardoza *et al.*, 2001)

Este trabajo muestra por primera vez la presencia de dos intermediarios en el desplegamiento de la TIM. La caracterización del patrón de desnaturalización con GdnHCl por técnicas espectroscópicas indica la existencia de un patrón de desnaturalización de tres estados (Tabla V). Sin embargo, el uso de la cromatografía de exclusión molecular nos permitió observar que las dos transiciones observadas por fluorescencia, SCM y DC: $D \rightleftharpoons D^*$ y $D^* \rightleftharpoons 2U$, incluyen en realidad tres transiciones $D \rightleftharpoons D^* \rightleftharpoons 2M^* \rightleftharpoons 2U$ (sólo detectables por cromatografía). Por otro lado, nuestros resultados explican la irreversibilidad del proceso en términos de la presencia de agregados formados muy probablemente por la asociación incorrecta de los intermediarios D^* y M^* como se ha observado para otras proteínas (Fink, 1998).

No es muy claro cómo a pesar de tener estructuras terciarias y cuaternarias prácticamente idénticas, las TIMs de diferentes especies pueden tener mecanismos de desplegamiento tan diferentes. A pesar del alto porcentaje de identidad en las diferentes secuencias reportadas para las diferentes TIMs, del 100% de la conservación de los residuos del sitio activo y a la gran identidad en la sobreposición de algunas estructuras (Wierenga & Noble, 1992), es claro que la estabilidad de los intermediarios es diferente en las diferentes TIMs.

Resultados preliminares con la TIM de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) muestran que el grado de complejidad en la presencia de intermediarios puede ser todavía mayor (Vázquez-Contreras *et al.*, en preparación), y sería importante entender si el hecho de que la LmTIM, la TbTIM y la TcTM son proteínas glicosomales (Oppendoes & Borst, 1977) está relacionado con la existencia de intermediarios. Como la síntesis de la TIM de estos organismos ocurre en el citosol y posteriormente la proteína se transporta al glicosoma,

(Opperdoes *et al.*, 1984), sería importante conocer si la presencia de estos intermediarios tiene algún papel en el transporte de la proteína a esta estructura. Es importante conocer si la presencia de más de un intermediario es característica de la TIM de los tripanosomátidos. Esto se entenderá con la dilucidación de patrones de plegamiento de TIMs de diferentes especies.

Conclusiones y Perspectivas

En el presente trabajo se caracterizó a la TIM de *Trypanosoma brucei*. Con el objetivo inicial de identificar la exposición al solvente de regiones de la proteína a lo largo de la curva de desnaturalización, se construyeron mutantes con Ws sustituidos. Las mutantes construidas, sobreexpresadas y purificadas fueron W12F, W159F y W12F/W193F. Para las mutantes W12F y W12F/W193F se determinaron sus parámetros catalíticos y espectroscópicos así como su estabilidad a la dilución. Por otro lado, al igual que la TbTIM, se determinó su patrón de desnaturalización en urea y GdnHCl.

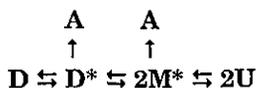
La desnaturalización de la TbTIM y las mutantes W12F/W193F por urea y por GdnHCl se puede describir como un proceso en el que se encuentra involucrado por lo menos un intermediario. La existencia de esta(s) especie(s) se propone a partir de la no coincidencia en las diferentes señales seguidas, así como por la presencia de una región en meseta observada a concentraciones entre 2.0 y 5.0 M de urea y entre 1.0 y 2.0 M de GdnHCl (por DC y fluorescencia). El aumento en la intensidad de fluorescencia del ANS, apoya la hipótesis sobre la existencia de una especie con regiones hidrofóbicas parcialmente expuestas al solvente en esos mismos intervalos de concentraciones.

La sustitución de los residuos W provoca una desestabilización de la proteína nativa con respecto a la proteína silvestre, que se refleja como una mayor sensibilidad al efecto del desnaturalizante y una meseta más evidente en ambos desnaturalizantes.

A partir de los patrones de desnaturalización obtenidos para las mutantes y de un análisis de la contribución a la fluorescencia de los W12 y W159 de la TbTIM, se propuso un esquema gradual de las diferentes regiones de la TbTIM que se exponen durante la desnaturalización por urea y GdnHCl.

Por otro lado, se calibró una columna de exclusión molecular para determinar el R_s de la TbTIM al aumentar la concentración de GdnHCl. Los datos hidrodinámicos obtenidos muestran la presencia de dos intermediarios durante la desnaturalización por GdnHCl. Se observó también que los intermediarios coexisten con una especie de alto peso molecular que proponemos como un agregado. La presencia de estas moléculas agregadas correlaciona con la región donde se no se observa ningún porcentaje de reversibilidad en el proceso de desnaturalización.

Se obtuvo el perfil cromatográfico de la desnaturalización por GdnHCl de una mutante monomérica donada por la Dra. Gloria Saab (IBT, UNAM). Gracias a la comparación de los datos obtenidos por el dímero nativo y la mutante monomérica, fue posible proponer un estado de asociación para los dos intermediarios observados por cromatografía en la TbTIM: un intermediario dimérico D^* y un intermediario monomérico M^* . Los resultados de la desnaturalización de la TbTIM inducida por GdnHCl seguida por diferentes técnicas, nos permitieron proponer un modelo en el cual existen 4 estados solubles D , D^* , M^* y U , así como un agregado A . Los datos de fluorescencia, actividad catalítica y DC permiten observar las transiciones $D \rightleftharpoons D^*$ y $D^* \rightleftharpoons 2U$. Sin embargo, los datos de cromatografía permiten observar una tercera transición incluida en la segunda transición observada por técnicas espectroscópicas. El modelo propuesto es el siguiente:



Este trabajo deja abiertas varias vías de exploración en la estabilidad de la TbTIM. Además de las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F se construyeron las siguientes

mutantes: W90Y, W170F y W193F. Y también algunas mutantes múltiples: W90Y/W159F, W12F/W90Y, W12F/W90Y/ W159F y W170F/W193F que se utilizaron para construir dos mutantes cuádruples, W90Y/W159F/W170F/W193F (Trp12) y la W12F/W90Y/W159F/W193F (Trp170). Se construyó también una mutante sin triptofanos. De todas estas construcciones sólo se sobreexpresó y purificó la mutante llamada Trp170. Esta mutante resulta interesante ya que el W170 es uno de los residuos más conservados en la TIM de diferentes especies (de las secuencias reportadas, sólo la TIM de *Pyrococcus woesei* no tiene W en esta posición). Por otro lado, este residuo se encuentra en el asa catalítica, por lo que sería interesante seguir la fluorescencia del W170 como resultado de la unión de análogos del sustrato o el desplegamiento seguido por fluorescencia de un sólo residuo W.

La mutante Trp12, sólo posee al W de la interfase. Por lo que sería posible seguir los cambios en la fluorescencia del W12 como resultado de la disociación por desnaturalización con agentes químicos o por efecto de la dilución.

La mutante de TbTIM sin triptofanos puede servir potencialmente para insertar algún residuo W en alguna región particular y seguir su fluorescencia.

Hay que aclarar que uno de los resultados de este trabajo es que la sustitución del W12 y W193 en la W12F y W12F/W193F provoca que la enzima sea más sensible a los efectos de dilución y de concentración de los dos desnaturalizantes empleados. Por lo que es muy probable que la purificación y caracterización de las mutantes múltiples no sea exitosa, o bien que la proteína no se comporte de manera parecida a la proteína silvestre en su patrón de desnaturalización. Por otro lado, es necesario determinar el estado de asociación de cada una de estas mutantes, ya que resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo (Hernández-Alcántara *et al.*, 2002) indican que en ocasiones, la sustitución de un sólo residuo en la

TbTIM (en su caso C14F), puede provocar que la enzima pierda su estado de asociación dimérico.

La calibración de una columna de filtración molecular en condiciones nativas y desnaturalizantes (GdnHCl 6M), y los resultados que se obtuvieron de ella, exige la obtención del R_s para la TbTIM desnaturalizada por urea. Es necesario realizar la calibración de la columna a 8 M de urea, utilizando los valores de R_s reportados en la bibliografía para esta concentración de desnaturalizante (Uversky, 1993). Si los datos en condiciones nativas y en 8M de urea se ajustan a una sola curva como en el caso de los datos con 6M de GdnHCl, en principio se podría obtener más información sobre la o las especies que se encuentran en la región de meseta que reporta un aumento en la intensidad de fluorescencia del ANS (2.0-5.0 M urea). También se podría saber si la irreversibilidad en el proceso se debe a la formación de agregados. Si este no es el caso, habría que incursionar en la posibilidad de que esta irreversibilidad se deba a degradación química.

Por otro lado, la agregación siempre se ha considerado un evento indeseable en los estudios de plegamiento de proteínas. Es difícil reportar datos con proteínas que se agregan y que presentan un proceso de desnaturalización irreversible. Sin embargo, los agregados han empezado a ser el blanco de la investigación de varios grupos. Esto se debe a que en los últimos años, los agregados de proteínas mal plegadas se han relacionado con las llamadas enfermedades conformacionales como las amiloidosis, las enfermedades priogénicas y algunos otros desórdenes que involucran depositación de agregados proteicos.

Se dice que los agregados encontrados durante el plegamiento o desplegamiento de las proteínas, se forman por la agregación hidrofóbica de estados parcialmente plegados o desplegados. Algunos estudios han propuesto que la agregación se debe a la asociación

específica de intermediarios parcialmente plegados y que la agregación puede favorecerse si se mantienen las condiciones que promueven la presencia de estas especies (Fink, 1998., Uversky *et al.*, 2001), por lo que es importante establecer las propiedades de estos intermediarios que tienden a agregarse.

La agregación se ha considerado por mucho tiempo como un proceso no específico, sin embargo, reportes recientes indican que el fenómeno es resultado de interacciones intermoleculares específicas entre intermediarios del plegamiento como los glóbulos fundidos. La caracterización de los agregados ha mostrado que éstos tienen una estructura ordenada, particularmente rica en estructura β -plegada (Jackson *et al.*, 1999., Uversky *et al.*, 2001.) Incluso se ha mapeado el sitio de nucleación de un intermediario glóbulo fundido que forma agregados ricos en estructura β -plegada, donde se observa que el área de contacto de la proteína agregada es específica e involucra a ciertos residuos (Hammarström *et al.*, 1999).

Por todo esto, los agregados constituyen otra fuente de investigación. En este trabajo, los agregados aparecen como una especie relativamente uniforme en tamaño. Aunque el R_s máximo que alcanza a resolver la columna es 54.0 Å, y los agregados son de aproximadamente 47.0 Å, siempre hemos atribuido el tamaño uniforme a que el volumen de elución de los agregados está en el límite de exclusión de la columna. Sería muy interesante inyectar estas muestras a una columna con un intervalo de resolución de masa molecular mayor, para determinar si la especie A está formada efectivamente por especies del mismo tamaño. Posteriormente sería interesante separar a la especie A por esta misma técnica y determinar su contenido de estructura secundaria.

Aunque la TbTIM ha resultado ser una enzima difícil de caracterizar, debido a la irreversibilidad y agregación del proceso, las anteriores propuestas permitirían obtener más información sobre el proceso de desplegamiento de la TbTIM.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Referencias bibliográficas

- Albery, W. J. & Knowles, J. R. (1976) Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry* 15, 5631-5640
- Alvarez, A., Zeelen, J. Ph., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K. & Maes, D. (1998) Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. *J. Biol. Chem.* 273, 2199-2206
- Andreotti, G., Cubelis, M.V., Di Palo, M., Fessas, D., Sannia, G. & Marino, G. (1997) Stability of a thermophilic TIM-barrel enzyme: indole-3-glycerol phosphate synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J.* 223, 259-264
- Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181 (4096), 223-230
- Baldwin, R.L (1995) The nature of protein folding pathways: The classical versus the new view. *Journal of Biomolecular NMR.* 5, 103-109
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Willson, I. A., Conan, P. H., Furth, A. J., Milmar, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D. & Waley, S. G. (1975) Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using aminoacid sequence data. *Nature* 255, 609-614
- Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B. & Jaenicke, R. (1997) Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Science* 6, 2159-2165
- Benítez-Cardoza, C. G., Rojo-Domínguez, A. & Hernández-Arana, A. (2001) Temperature-induced denaturation and renaturation of triosephosphate isomerase from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of dimerization coupled to refolding of the thermally unfolded protein. *Biochemistry* 40 (30), 9049-9058
- Bilsel O., Zitzewitz, J. A., Bowers, E. & Matthews C. R. (1998). Folding mechanism of the α -subunit of tryptophan synthase, and α/β barrel protein: global analysis highlights the interconversion of multiple native, intermediate and unfolded forms through parallel channels. *Biochemistry* 38, 1018-1029
- Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D. & Knowles, J. R. (1988) Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry* 27 (4), 1158-1167
- Bohm, G., Muhr, R., & Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* 5, 191-195

Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J., Callens, M., Noble, M. E. M., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. M. & Wierenga, R. K. (1993) Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterization of a dimer-interface mutant. *Eur. J. Biochem.* 211, 703-710

Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R. & Wierenga, R. K. (1994) Design, creation and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 1515-1518

Borchert, T. V., Zeelen, J., Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R. & Wierenga, R. K. (1995) An interface point-mutation variant of triosephosphate isomerase is compactly folded and monomeric at low protein concentrations. *FEBS Letters* 367, 315-318

Branden, C. I. (1991) The TIM barrel- the most frequently occurring folding motif in proteins. *Curr. Op.Struct. Biol.* 1, 978-983

Branden, C. I. & Tooze, J. (1991) Introduction to protein structure. New York. Garland Publishing Inc.

Campbell, I. D. & Dwek, R. A. (1984) Biological spectroscopy. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. U.S.A.

Chávez-Cárdenas. M.E. (1998) El uso de 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS), para la identificación de intermediarios en la ruta de plegamiento de proteínas globulares. *Boletín de Educación Bioquímica* 17 (1), 11-17

Creighton, T. E. (1993) Proteins: Structures and molecular properties. W.H. Freeman and Co. New York. Second edition

Delboni, L. F., Mandé, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M. D., Martial, J. A., & Hol, W. G. J. (1995) Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Science* 4, 2594-2604

Dill, A.K. & Chan, H. S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* 4 (1), 10-18

Dobson, C. M., Evans, P. A. & Radford, S.E. (1994) Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far. *Trends. Biochem. Sci.* 19, 31-37

Eder, J. & Kirshner, K. (1992) Stable structures of eightfold $\beta\alpha$ -barrel proteins: fragment complementation of phosphoribosylanthranilate isomerase. *Biochemistry* 31, 3617-3625

Eftink, M. R. (1994) The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophysical Journal* 66, 482-501

- Farber, G. K. (1993) An α/β -barrel full of evolutionary trouble. *Curr. Op. Struct. Biol.* 3, 409-412
- Ferguson, N., Capaldi, A. P., James, R., Kleanthous, C. & Radford, S. E. (1999) Rapid Folding with a0nd without populated intermediates in the homologous four-helix proteins Im7 and Im9. *J. Mol. Biol.* 286, 1597-1608
- Fernández-Velasco, D. A. (1995) Plegamiento de proteínas. *Boletín de Educación Bioquímica* 14 (2), 5-10
- Fink, A. L. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding & Design* 3, R9-R23
- Gao, X. G., Garza-Ramos, G., Saavedra-Lira, E., Cabrera, N., De Gómez-Puyou, M. T., Pérez-Montfort, R. & Gómez-Puyou, A. (1998) Reactivation of triosephosphate isomerase from three trypaosomatids and human: effect of Suramin. *Biochem. J.* 332, 91-96.
- Garel, J-R. (1992) Folding of large proteins: multidomain and multisubunit proteins. En: Protein folding. T. E. Creighton (Ed). p 405-454
- Gokhale, R. S., Ray, S. S., Balaram, H. & Balaram, P. (1999) Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant. *Biochemistry* 38, 423-431
- Gualfetti, P.J., Iwakura, M., Lee, J. Ch., Kihara, H., Bilsel, O., Zitzewitz, J. A., & Matthews, C.R. (1999) Apparent radii of the native, stable intermediates and unfolded conformers of the α -subunit of tryptophan syntase from *E. coli*, a TIM barrel protein. *Biochemistry* 38, 13367-13378
- Hamaguchi, K.(1992) The Protein Molecule: Conformation, stability and folding. Japan Scientific & Societies Press. Springer Verlag.
- Hammarström, P. Persson, M., Freskgård, P. O., Mårtensson, L. G., Andersson, D., Jonsson, B.H. & Carlsson, U. (1999) Structural mapping of an aggregation nucleation site in a molten globule intermediate. *J. Biol. Chem.* 274 (46), 32897-32903
- Hernández-Alcántara, G., Mendoza-Hernández, G., Gomez-Puyou, A, Garza-Ramos, G., & Perez-Montfort, R. (2002) *Biochemistry, En prensa.*
- Hollecker, M., & Creighton, T. E. (1983) Evolutionary conservation and variation of protein. Folding pathways: Two protease inhibitor homologues from blackmamba venom. *J. Mol. Biol.* 168, 409-437
- Jackson, G. S., Hosszu, L. L. P., Power, A., Hill, A.F., Keeney, J., Saibil, H., Craven, C. J., Waltho, J. P., Clarke, A.R. & Collinge, J. (1999) *Science* 283, 1935-1937

- Jaenicke, R. (1987) Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 49, 117-237
- Jaenicke, R. (1996) Protein folding and association: in vitro studies for self-organization and targeting in the cell. *Current Topics in cellular recognition* (Stadtman, E. R. Y Chock, P. B., Eds) 34, 209-314
- Jaenicke, R. & Rudolph, R. (1989) Folding proteins. En: *Folding proteins in Protein Structure a practical approach*. Creighton, T.E. (Ed) IRL Press, Oxford University pp 191-223
- Jassanof, A., Davis, B. & Fersht, A. R. (1994) Detection of an intermediate in the folding of the $(\beta\alpha)_8$ -barrel N-(5'-Phosphoribosyl)anthranilate isomerase from *Escherichia coli* *Biochemistry* 33, 6350-6355
- Johnson, W.C. (1999) Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* 35, 307-332
- Joseph, D., Petsko, G. A. & Karplus, M. (1990). Anatomy of a conformational change: hinged "lid" motion of the triosephosphate loop. *Science* 249, 1425-1428
- Joseph-McCarthy, D., Lolis, E., Komives, E. A. & Petsko, G. A. (1994). Crystal structure of the K12M/G15A triosephosphate isomerase double mutant and electrostatic analysis of the active site. *Biochemistry* 33 (10), 2815-2823
- Kilhoffer, M-C., Roberts, D. M., Adibi, A. O., Watterson, D. M. & Haiech, J. (1988). Investigation of the mechanism of calcium binding to calmodulin. *J. Biol. Chem.* 263 (32), 17023-17029
- Kim, P.S. & R. L. Baldwin. (1982) Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 459-489
- Knowles, J.R. (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 350, 121-124
- Knowles, J.R. & Albery, W. J. (1977) Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase. *Act. Chem. Res.* 10, 105-111
- Kohl, L., Callens, M., Wierenga, R. K., Opperdoes, F. R. & Michels, P. A. M (1994). Triose-phosphate isomerase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and characterization of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and analysis of the protein. *Eur. J. Biochem.* 220, 331-338
- Kohlhoff, M., Dahm, A. & Hensel, R. (1996) Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Letters* 383, 245-250

- Kragelund, B. B., Hojrup, P., Jensen, M. S., Schjerling, C. K., Juul, E., Knudsen, J., & Poulsen, F. M. (1996) Fast and one-step folding of closely and distantly related homologous proteins of a four-helix bundle family. *J. Mol. Biol.* 256, 187-200
- Krebs, H., Schmid, F. X., & Jaenicke, R. (1983) Folding of homologous proteins: The refolding of different ribonucleases is independent of sequence variations, proline content and glycosylation. *J. Mol. Biol.* 169, 619-635.
- Krebs, H., Schmid, F. X., & Jaenicke, R. (1985) Native-like folding intermediates of homologous ribonucleases. *Biochemistry* 24, 3846-3852
- Lakowicz, J.R. (1999) Principles of fluorescence spectroscopy. (2nd Edition) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Lambeir, A.M., Backmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J.E., Kursula, I., Norledge, B. V. & Wierenga, R. K. (2000) The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase. *Eur. J. Biochem.* 267, 2516-2524
- Landa, A, Rojo-Domínguez, A., Jiménez, L., & Fernández-Velasco, D. A. (1997) Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur. J. Biochem.* 247, 348-355
- Lee, B. & Richards, F. M (1971) The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* 55, 379-400
- Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding? *J. Chem. Phys* 65, 44-45
- Lodi, P. J., Chang, L. C., Knowles, J. R. & Komives, E. A. (1994) Triosephosphate isomerase requires a positively charged active site: the role of Lysine-12. *Biochemistry* 33, 2809-2814
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. & Petsko, G. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 29, 6609-6618
- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frère, J-M., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A. & Goraj, K. (1996a). Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *J. Mol. Biol.* 257, 441-456.
- Mainfroid, V., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A. & Goraj, K. (1996b) Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual α -helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry* 35, 4110-4117
- Makhatadze, G. I., & Privalov, P. L. (1992) Protein interactions with urea and guanidinium chloride. *J. Mol. Biol.* 226, 491-505

Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez Puyou, A., & Pérez-Montfort, R. (1998) Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* 283, 183-203.

Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A. & Hol, W. G. J. (1994) Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase related human genetic disorders and comparison with the tripanosomal enzyme. *Protein Science* 3, 810-821.

Mann, C. J. Royer, C. A. & Matthews, R. (1993). Tryptophan replacements in the *trp* aporepressor from *Escherichia coli*: probing the equilibrium and kinetic folding models. *Protein Science* 2, 1853-1861

Matthews, C.R. (1991) The mechanism of protein folding. *Curr. Op. Struct. Biol.* 1, 28-35

Matthews, C.R. (1993) Pathways of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 653-683

Mc Vittie, J. D., Esnouf, M. P. & Peacocke A. R. (1977) The denaturation-renaturation of chicken-muscle triosephosphate isomerase in guanidinium chloride. *Eur. J. Biochem.* 81, 307-315

Mogi, T., Marti, T. & Khorana, G. (1989) Structure-function studies on bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.* 264 (24), 14197-14201

Morgan, C.J., Wilkins, D.K., Smith, L.J., Kawata, Y., & Dobson, C.M. (2000) A compact monomeric intermediate identified by NMR in the denaturation of dimeric triose phosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 300, 11-16

Noble, M. E. M., Zeelen, J. Ph. & Wierenga, R. K. (1993a) Structures of the "open" and "closed" state of trypanosomal triosephosphate isomerase, as observed in a new crystal form: implications for the reaction mechanism. *Proteins* 16, 311-326

Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Manfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A.C. & Martial, J. A. (1993b) Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallog.* D49, 403-417.

Opperdoes, F.R. & Borst, P. (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Letters* 80 (2), 360-364

Opperdoes, F.R, Baudhuin, P., Coppens, I., De Roe, C., Edwards, S. W., Weijers, P.J. & Misset, O. (1984) Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* 98, 1178-1184

- Pace, C. N., Shirley, B. A. & Thomson, J. A. (1989) Measuring the conformational stability of a protein. En: Folding proteins in Protein Structure a practical approach. Creighton, T.E. (Ed) IRL Press, Oxford University. p. 311-330
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4, 2411-2423
- Pande, V. S., Grosberg, A. Y., Tanaka, T., & Rokhsar, D. S. (1998) Pathways for protein folding: is a new view needed? *Curr. Op. Struct. Biol.* 8, 68-79
- Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schroder, K., Marahiel, M.A., Jaenicke, R. & Schmid, F. (1998) Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins. *Nat. Struct. Biol.* 5 (3), 229-235
- Pompliano, D. L., Peyman, A. & Kowles, J. R. (1990) Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: Definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 29 (13), 3186-3197
- Ptitsyn, O. B., Pain, R. H., Semisotnov, G. V., Zerovnik, E. & Razgulyaev, O. I. (1990) Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Letters*, 262, 20-24
- Rietveld, A. W. M. & Ferreira, S. T. (1998) Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: the importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry*, 37, 933-937
- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo-Yauner, L., Kornhauser, A. & Fernández-Velasco, D. A. (enviado) Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*.
- Rose, I. A., Fung, W.J. & Warms, J. V. B. (1990). Proton diffusion in the active site of triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 29, 4312-4317
- Royer, C. A., Mann, C. J. & Matthews, R. (1993). Resolution of the fluorescence equilibrium unfolding profile of *trp* aporepressor using single tryptophan mutants. *Protein Science* 2, 1844-1852
- Rudolph, R. Siebedritt, R. & Kiefhaber, T. (1992) Reversible unfolding and refolding behavior of monomeric aldolase from *Staphylococcus aureus*. *Protein Science* 1, 654-666
- Saab-Rincón, G., Juárez, V.R., Osuna, J., Sanchez, F., & Soberón, X. (2001) Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Eng.* 14, 149-155
- Sali, A., E.I., Shakhnovich, & Karplus, M. (1994) How does a protein fold? *Nature* 369, 248-251

- Sampson, N. S. & Knowles, J. R. (1992) Segmental movement: Definition of the structural requirements for loop closure in catalysis by triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 31: 8482-8487
- Sánchez del Pino, M. M. & Fersht, A. R. (1997) Nonsequential unfolding of the α/β barrel protein indole-3-glycerol-phosphate synthase. *Biochemistry* 36, 5560-5565
- Schimd, F. X. (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. En: Folding proteins in Protein Structure a practical approach. Creighton, T.E. (Ed) IRL Press, Oxford University.
- Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., & Wierenga, R. (1996). Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Science* 5, 229-239
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R. & Wierenga, R (1997). A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* 36 (2), 9655-9662
- Schurig, H., Beaucamp, N., Ostendorp, R., Jaenicke, R., Adler, E & Knowles, J. R. (1995) Phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* form a covalent bifunctional enzyme complex. *EMBO J.* 14 (3), 442-451
- Semisotnov, G.V., N.A. Rodionova, V.P. Kutysenko, Ebert, B., Blanck, J. & O.B. Ptitsyn. (1987) Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B. *FEBS Letters* 24 (1), 9-13
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A.F. & Gilmanshin, R. I. (1991) Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* 31, 119-128
- Stackhouse, T. M., Onuffer, J. J., Matthews, R., Ahmed, S.A., & Miles, E. W. (1988) Folding of homologous proteins: Conservation of the folding mechanisms of the α subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and five interspecies hybrids. *Biochemistry* 27, 824-832
- Stryer, L. (1965) The interaction of naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobine: a fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.* 13, 482-495
- Sun, J. & Sampson, N. S. (1998) Determination of the amino acid requirements for a protein hinge in triosephosphate isomerase. *Protein Science* 7, 1495-1505
- Swinkels, B. W., Gibson, W. C., Osinga, K. A., Kramer, R., Veeneman, G. H., H. van Boom, J. & Borst, P. (1986). Characterization of the gene for the microbody (glycosomal) triosephosphate isomerase of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 5 (6), 1291-1298

Taddei, N., Chiti, F., Paoli, P., Fiaschi, T., Bucciantini, M., Stefani, M., Dobson, C. M. & Ramponi, G. (1999) Thermodynamics and kinetics of folding of common-type acylphosphatase: comparison to the highly homologous muscle isoenzyme. *Biochemistry* 38, 2135-2142

Tanford, C. (1970) Protein denaturation part C. *Adv. Protein Chem.*, 24, 1-95

Uversky, V.N. (1993) Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* 32, 13288-13298

Uversky, V.N. & Ptitsyn, O. B. (1996) Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J. Mol. Biol.* 255, 215-228

Uversky, V.N., Lee, H.J. Li, J., Fink, A., & Lee, S.J. (2001) Stabilization of partially folded conformation during α -synuclein oligomerization in both purified and cytosolic preparations. *J. Biol. Chem.* 276 (47), 43495-43498

Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R. A., Mendoza-Hernández, G., Costas, M. & Fernández-Velasco, D. A. (2000) Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein and Peptide Letters* 7, 57-64

Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P. & Murthy M. R. N. (1997) Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* 5, 751-761.

Walden, H., Bell, G.S., Russell, R.J.M., Siebers, B., Hensel, R., & Taylor, G.L. (2001) Tiny TIM: A small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol* 306, 745-757

Waldman, A. D. B., Clarke, A. R., Wigley, D. B., Hart, K. W., Chia, W. N., Barstow, D., Atkinson, T., Munro, I. & Holbrook, J. J. (1987). The use of site-directed mutagenesis and time-resolved spectroscopy to assign the fluorescence contributions of individual tryptophan residues in *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. *Biochem. et Biophysica Acta* 913, 66-71

Waley, S. G. (1973) Refolding of triose phosphate isomerase. *Biochem. J.* 135, 165-172

Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Postma, J. P. M., Groendijk, H., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. & Opperdoes, F. R. (1991a) The crystal structure of the "open" and the "closed" conformation of the flexible loop of trypanosomal triosephosphate isomerase. *Proteins* 10, 33-49

Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., & Hol, W. G. J. (1991b) Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 ammonium sulphate. *J. Mol. Biol.* 220, 995-1015

Wierenga, R. K. & Noble, M. E. M. (1992) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 224, 1115-1126

Williams, J. C & McDermott, A. E. (1995) Dynamics of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated. *Biochemistry* 34 (26), 8309-8319

Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vried, G., Backmann, J., Michels, P. A. M., Lambeir, A-M. & Wierenga, R. K. (1999) Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng.* 12(3), 243-250

Zabori, S., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1980) Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z. Naturforsch.* 35C, 999-1004

Zerovnik, E., Lenarcic, B., Jerala, R. & Turk, V. (1991a). Folding studies of the cysteine proteinase inhibitor-human stefin A. *Biochemica et Biophysica Acta* 1078, 313-320

Zerovnik, E., Lohner, K., Jerala, R., Laggner, P. & Turk, V. (1991b) Calorimetric measurements of thermal denaturation of stefins A and B. Comparison to predict thermodynamics of stefin-B unfolding. *Eur. J. Biochem.* 210, 217-221

Zerovnik, E., Jerala, R., Kroon-Zitko, L., Pain, R. H. & Turk, V. (1992) Intermediates in denaturation of a small globular protein, recombinant human stefin B. *J. Biol. Chem.* 267 (13), 9041-9046

Zerovnik, E., Jerala, R., Kroon-Zitko, L., Turk, V. & Lohner, K. (1997) Characterization of the equilibrium intermediates in acid denaturation of human stefin B. *Eur. J. Biochem.* 245, 364-372

Zerovnik, E., Virden, R., Jerala, R., Turk, V., & Waltho, J. P. (1998) On the mechanism of human stefin B folding: I. Comparison to homologous Stefin A. Influence of pH and trifluoroethanol on the fast and slow folding phases. *Proteins* 32, 296-303

EL USO DE 1-ANILINO-8 NAFTALENOSULFONATO (ANS), PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INTERMEDIARIOS EN LA RUTA DE PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS GLOBULARES

María Elena Cháñez Cárdenas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70242, 04510 D.F. México Tel. (52 5) 622 5657, FAX (52 5) 622 5630.

RESUMEN

La fluorescencia del 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) es dependiente de la polaridad del ambiente, incrementándose conforme la polaridad disminuye. El aumento en la intensidad de la fluorescencia del ANS al unirse a regiones hidrofóbicas durante estudios de desnaturalización y renaturalización de proteínas *in vitro* ha permitido evidenciar la presencia de intermediarios que no tienen un empaquetamiento rígido en el interior de la proteína. Estos intermediarios se conocen como glóbulos fundidos y se han encontrado en la ruta de plegamiento de muchas proteínas globulares.

PALABRAS CLAVE: ANS, glóbulo fundido, fluorescencia, proteínas globulares, desnaturalización, renaturalización.

ABSTRACT

Fluorescence of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate (ANS) depends on the polarity of the environment, increasing as the polarity diminishes. The increase in fluorescence intensity of ANS bound to hydrophobic regions during denaturation and renaturation studies of proteins has led to the identification of folding intermediates that lack rigid packing at the center of the molecule. These intermediary states are known as molten globules and have been found in many folding routes of globular proteins.

KEY WORDS: ANS, molten globule, fluorescence, globular proteins, denaturation, renaturation

INTRODUCCIÓN

Para ser biológicamente activas, las proteínas deben adoptar una estructura tridimensional única, que constituye su conformación nativa y funcional. La adopción de esta conformación ocurre durante y después de la

síntesis de las mismas en los ribosomas. *In vivo*, algunos pasos del plegamiento son catalizados por proteínas como la peptidil *cis-trans* isomerasa o la isomerasa de disulfuros, y por las chaperoninas, que evitan la agregación irreversible en condiciones extremas. Sin embargo, *in vitro*, es posible llevar a cabo el plegamiento de proteínas pequeñas y globulares sin información o energía adicional, modificando solamente las condiciones del disolvente.

Siguiendo los cambios en actividad catalítica, diroísmo circular (DC), la fluorescencia intrínseca o extrínseca, es posible seguir los cambios conformacionales durante la desnaturalización de una proteína al aumentar la temperatura, presión, concentración de solutos o bien modificando el pH. Cuando las condiciones fisicoquímicas del disolvente regresan a las fisiológicas se recupera la conformación nativa y la función de la proteína. Esto indica que en la conformación nativa, las interacciones entre la secuencia de aminoácidos y el ambiente que los rodea juegan un papel determinante.

Si tomamos en cuenta el número de conformaciones posibles que puede adoptar una cadena polipeptídica, este número es tan grande, que el tiempo en que una cadena polipeptídica adoptaría su estructura nativa explorando al azar todos estos conformeros sería mayor a la edad del universo (1). A pesar de esto, las proteínas se pliegan en períodos de milisegundos a segundos. Esta observación se conoce como la paradoja de Levinthal, quien en 1968, sugirió la existencia de rutas preferenciales de plegamiento. Esto llevó a proponer la existencia de intermediarios cinéticamente accesibles, estados transitorios que de alguna manera "dirigieran" la ruta de plegamiento de las proteínas. Si estos estados existieran y fuera posible establecer sus estructuras y energías, se podrían determinar los factores que guían el plegamiento por rutas productivas. Los estudios sobre intermediarios en el plegamiento de las

proteínas después de 1988, indican que existen conformaciones llamadas "estados desnaturalizados compactos". De estos estados los más conocidos son los "molten globules" o glóbulos fundidos.

EL GLÓBULO FUNDIDO Y LA IMPORTANCIA DE UN INTERMEDIARIO EN LOS ESTUDIOS DE PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

El glóbulo fundido es una conformación con mucha estructura secundaria, sin interacciones terciarias fijas. Esta conformación presenta los grupos aromáticos expuestos al solvente, un alto grado de compactación pero sin empaquetamiento rígido en el interior de la molécula y un incremento en las fluctuaciones de las cadenas laterales. Este tipo de intermediarios se acumulan en los primeros estadios del plegamiento de muchas proteínas, lo que sugiere la existencia de una cinética general en este proceso.

Una consecuencia importante de la adquisición de estas conformaciones transitorias es que se limita el número de éstas que una cadena polipeptídica puede tener, para conducir, de una búsqueda azarosa de conformaciones hacia estructuras energéticamente accesibles.

Los métodos que pueden utilizarse para caracterizar la conformación de estos intermediarios que se forman en la fase más rápida del plegamiento (10^{-2} s) son pocos, aunque se tienen resultados de dicroísmo circular, espectroscopia de resonancia del espín del electrón (*electron spin resonance spectroscopy*) y resonancia magnética nuclear (NMR). El objetivo de esta revisión es resumir algunos resultados sobre el uso de una prueba más simple para evidenciar y caracterizar intermediarios conformacionales de plegamiento de proteínas como el glóbulo fundido.

EL USO DE LA FLUORESCENCIA EN EL ESTUDIO DE PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

La medición de cambios en la intensidad de fluorescencia es una de las técnicas más utilizadas para proveer de información cinética y termodinámica en los estudios de transición de macromoléculas. Esto se debe principalmente a que la sensibilidad de la fluorescencia permite realizar estudios con concentraciones micromolares o menores de la molécula a estudiar.

Los fluoróforos usados en bioquímica pueden ser intrínsecos (como los residuos de triptofanos de la misma proteína) o extrínsecos (moléculas que al estar en contacto con la proteína presentan cambios en la intensidad de su fluorescencia). Los fluoróforos extrínsecos,

pueden unirse covalente o no covalentemente a la molécula de interés. La fluorescencia refleja las interacciones del fluoróforo con las moléculas circundantes, especialmente aquellas presentes durante el estado excitado. La fluorescencia es muy sensible y varios parámetros de ésta como la $\lambda_{\text{máx}}$ (longitud de onda de máxima emisión), la intensidad de fluorescencia y la vida media pueden ser afectados de diferentes maneras.

UNA PRUEBA EXTRÍNSECA PARA EL PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

El fluoróforo extrínseco 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) (Fig. 1) presenta una banda de absorción máxima entre los 270 y 360 nm. Al absorber luz, la molécula del ANS pasa de su estado basal al excitado. En este estado, el momento dipolar del ANS es mucho mayor que en el estado basal y por lo tanto la interacción del ANS con las moléculas que lo rodean es diferente de la que existía antes de la absorción. La reorientación y la transferencia de energía a las moléculas vecinas permite que el ANS vuelva poco a poco a su estado basal.

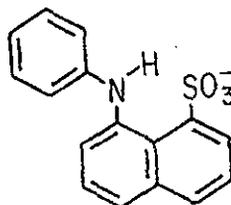


Figura 1. Estructura del 1-anilino-8-naftaleno sulfonato.

La fluorescencia del ANS presenta una dependencia de la polaridad del ambiente. Esta característica se ha demostrado para varios alcoholes y para mezclas de agua y etanol. El espectro de emisión de la fluorescencia del ANS se mueve hacia longitudes de onda menores, y la intensidad de la fluorescencia aumenta mientras los disolventes son cada vez menos polares, (por ejemplo, en la Fig. 2 se muestra como la intensidad de la fluorescencia aumenta mientras la polaridad del medio disminuye en el siguiente orden de disolventes: etilenglicol, metanol, n-propanol, n-butanol y n-octanol). En porcentajes diferentes de etanol mezclado con agua se observa el mismo comportamiento. (Fig. 2)

El ANS se empezó a relacionar con la estructura de las proteínas cuando se reportó que la fluorescencia mínima del ANS se incrementaba cuando este fluoróforo se unía a albúmina de suero de bovino. Posteriormente, se utilizó al ANS en la unión de apoproteínas. Lubert

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

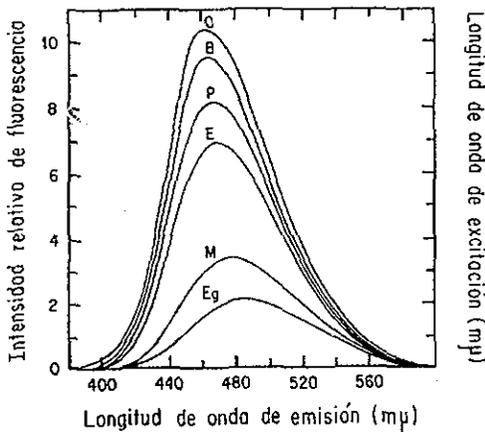


Figura 2. Espectro de emisión de fluorescencia de 10^{-4} M de ANS en diferentes alcoholes. La intensidad de fluorescencia aumenta y el máximo de emisión se mueve hacia el azul (de 480 a 450 nm) mientras la polaridad del disolvente disminuye en el siguiente orden: etilenglicol (Eg), metanol (M), etanol (E), n-propanol (P), n-butanol (B) y n-octanol (O) (Stryer, 1965).

Stryer, en 1965, publicó un extenso trabajo sobre la unión de ANS a la apohemoglobina y a la apomioglobina bajo la suposición de que este fluoróforo se unía a regiones hidrofóbicas y que las interacciones entre el hemo y la globina eran de naturaleza no polar (2). Si la hipótesis de que la región de unión del hemo es hidrofóbica es correcta, el ANS debería de formar complejos con ella.

De este trabajo se desprendieron varias observaciones como son: la estequiometría 1:1 de ANS-apoproteína, el desplazamiento del ANS por unión del grupo hemo y la identificación de las características de la fluorescencia del ANS en ambientes con diferentes polaridades. Pero sobre todo, se hicieron dos observaciones importantes: la primera es que la afinidad del ANS por la apoproteína disminuye y notoriamente a pH 5, lo que significa que a pHs ácidos el sitio de unión a ANS se pierde, ya que la proteína se encuentra desnaturalizada y no existen regiones hidrofóbicas en la proteína que lo unan. La segunda es que se propone el uso de esta molécula para detectar cambios en la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, que afecten la accesibilidad de regiones no polares.

El uso de ANS en estudios estructurales se extendió cuando se obtuvo el dímero del ANS, el 1,1-bis(4-anilino-5-naftaleno ácido disulfónico) o bis-ANS y se comprobó que las propiedades espectroscópicas de

esta molécula son similares a las del compuesto original y que la afinidad por la albúmina de suero de bovino es dos órdenes de magnitud mayor que la del ANS (3). Se considera que el bis-ANS, al igual que el ANS es una molécula que se une a superficies hidrofóbicas de proteínas. El bis-ANS tiene una fluorescencia mínima en ambientes polares y su emisión aumenta considerablemente en ambientes no polares. Se usa de manera indistinta con el ANS, en estudios de cambios conformacionales en las proteínas.

Este último compuesto se ha usado para seguir la desnaturalización y renaturalización reversible de la chaperonina GroES. Por medio de anisotropía de fluorescencia, fluorescencia intrínseca, velocidad de sedimentación y unión de bis-ANS se observó que la desnaturalización con urea y la renaturalización de esta proteína es un proceso reversible y espontáneo que no requiere de otras proteínas para que GroES se pliegue a su estado nativo y recupere su actividad (4).

LAS PRIMERAS EVIDENCIAS SOBRE LA EXISTENCIA DEL GLÓBULO FUNDIDO

Las primeras evidencias sobre la existencia de un glóbulo fundido se obtuvieron desnaturalizando proteínas globulares con concentraciones crecientes de cloruro de guanidina (Gu-HCl). Los espectros de DC en la región del UV lejano, mostraban la existencia de una estructura semejante a la nativa, y por otro lado, en la región del UV cercano, una estructura semejante a la desnaturalizada. Esto sugería la existencia de intermedios estables, parcialmente desnaturalizados, con un ambiente poco simétrico para los grupos aromáticos, pero con estructura secundaria comparable a la conformación nativa. Estudios posteriores con α -lactalbúmina mostraron que estos intermedios podían obtenerse usando concentraciones moderadas del desnaturalizante GdnHCl, a pH ácido moderado o aumentando la temperatura. La conclusión de estos trabajos, fue que las α -lactalbúminas tanto de humano como de bovino, presentan formas intermedias a la nativa y a la desnaturalizada (5).

Se obtuvieron resultados iguales para otras proteínas como la anhidrasa carbónica y el citocromo C, entre otras. Se propuso que la estabilidad del estado intermedio compacto o glóbulo fundido, se debía a las interacciones hidrofóbicas de la molécula, lo que llevó a utilizar sondas conocidas capaces de unirse a regiones hidrofóbicas para que se unieran a las regiones hidrofóbicas de las proteínas en el estado de glóbulo fundido. Algunos de los estudios con diferentes proteín-

nas que identifican la existencia de un glóbulo fundido y las técnicas utilizadas se explican a continuación y se encuentran resumidas, junto con los resultados obtenidos, en la tabla I.

Experimentos realizados con la anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino, mostraron el incremento de la fluorescencia de la molécula del ANS cuando se unía a la cadena polipeptídica durante la renaturalización de la proteína. Se observó que el ANS se unía débilmente tanto a la proteína desnaturalizada como a la proteína nativa en un tiempo menor a 1 ms. Esto sugiere que el incremento en la intensidad de fluorescencia del ANS durante la renaturalización de la proteína, refleja la cinética de formación de los núcleos hidrofóbicos (6).

Las curvas de intensidad de fluorescencia del ANS contra tiempo muestran dos etapas (Fig. 3). En la primera, la intensidad de fluorescencia aumenta rápida y simultáneamente al proceso de compactación (medido por DC), lo cual sugiere que se forman núcleos hidrofóbicos en el mismo tiempo. En la segunda, la intensidad de fluorescencia disminuye y esto aparentemente se debe a la desolvatación de los núcleos hidrofóbicos por formación de una estructura nativa rígida con interacciones terciarias estables. A partir de estos trabajos el aumento en la intensidad de fluorescencia del ANS se utilizó como una prueba que evidenciaba la existencia del glóbulo fundido.

Por otro lado, estudios con la anhidrasa carbónica y otras proteínas muestran que si se sigue la intensidad

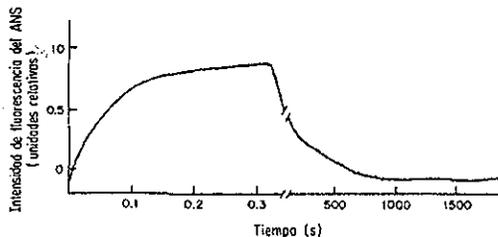


Figura 3. Renaturalización de la anhidrasa carbónica. Intensidad de fluorescencia del ANS contra tiempo durante el proceso de renaturalización de la anhidrasa carbónica. Se observan claramente dos etapas: en la primera, que representa los primeros segundos del proceso de renaturalización, se observa que la intensidad de fluorescencia aumenta rápidamente (y corresponde al proceso de compactación medido por DC (6)). Es en esta etapa cuando se han formado núcleos hidrofóbicos capaces de unir al ANS. La segunda etapa inicia donde se interrumpe la escala. A estos tiempos largos, la intensidad de fluorescencia del ANS disminuye, indicando que la proteína renaturalizada que se encuentra ahora en estado nativo no une ANS ya que sus núcleos hidrofóbicos no están expuestos.

de fluorescencia del ANS cuando se aumenta una condición desnaturalizante como el pH o la concentración de cloruro de guanidina, es muy claro que las conformaciones nativa y desnaturalizada no unen ANS (Fig. 4). A valores pequeños o muy altos de desnaturalizante, la intensidad de fluorescencia del ANS es mínima. Sin embargo, a concentraciones intermedias de desnaturalizante, en las que se favorece la existencia o formación de intermediarios, la fluorescencia se incrementa significativamente. La existencia de este máximo de emisión en la fluorescencia del ANS al desnaturalizar algunas proteínas, indica que en esas condiciones se acumulan configuraciones transitorias con características semejantes a las de un glóbulo fundido (7).

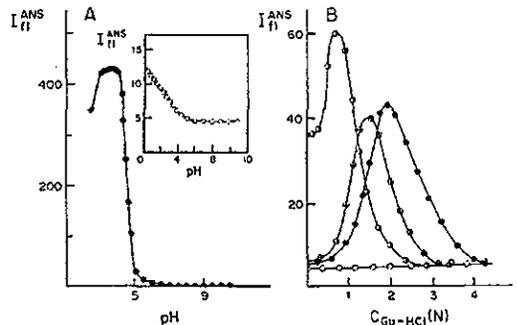


Figura 4. Cambio en la intensidad de fluorescencia a 480 nm de 250 mM de ANS libre (O) y en presencia de anhidrasa carbónica de bovino (●) al aumentar el pH. B. Cambio en la intensidad de fluorescencia de la anhidrasa carbónica de bovino (●), la anhidrasa carbónica de humano (⊗) y la β-lactamasa de *Staphylococcus aureus* (○) al aumentar la concentración de cloruro de guanidina (Gu-HCl). Obsérvese como a bajas y altas concentraciones de desnaturalizante (presencia de estado nativo y desnaturalizado respectivamente), los valores de intensidad de fluorescencia del ANS son pequeños. El pico de intensidad refleja la presencia de conformaciones intermedias que unen favorablemente ANS (7).

ALGUNOS EJEMPLOS DEL USO DEL ANS EN ESTUDIOS DE PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

Uno de los trabajos más completos que utiliza el ANS para caracterizar un estado intermedio y cambios conformacionales en las proteínas es el que utilizó a la β-lactamasa de *Staphylococcus aureus*, la α-lactalbúmina de humano, la β-lactoglobulina de bovino, la fosfoglicerato cinasa de levadura, así como la anhidrasa carbónica de bovino (CAB). En la renaturalización de estas cinco proteínas se observaron dos fases: la formación de un glóbulo fundido, seguida de la transición al estado nativo. La formación del

glóbulo fundido corresponde al máximo de fluorescencia y a la formación de un núcleo hidrofóbico (8). La velocidad del incremento en la fluorescencia del ANS es igual a la velocidad de compactación de estas proteínas medida por otras metodologías.

Estudios previos con β -lactamasa, caracterizan dos estados intermediarios con propiedades semejantes al glóbulo fundido bajo condiciones de pH diferente y alta concentración de sal. En este trabajo se siguió la desnaturalización de la β -lactamasa entre pH 2.5 y 11.5 en baja fuerza iónica. La desnaturalización se siguió por DC en el UV cercano y lejano, así como por fluorescencia de los triptofanos. Se encontró un primer intermediario (llamado "A") en condiciones de alta fuerza iónica y bajo pH. Este intermediario posee una estructura secundaria semejante a la conformación nativa pero una estructura terciaria "desordenada". Con alta fuerza iónica y pH alcalino, se encontró otro intermediario (llamado "B"). Este estado es compacto pero más expandido que el estado nativo. Aunque "A" se agrega con gran facilidad, "A" y "B" unen ANS fuertemente, mientras que los estados nativo y desnaturalizado no lo hacen. Esto sugiere que "A" y "B" presentan un incremento en su superficie hidrofóbica expuesta y accesible al solvente.

Los resultados obtenidos en combinación con DC y fluorescencia intrínseca permiten concluir que las interacciones hidrofóbicas tienen una gran importancia en la formación de estos estados intermediarios y el ambiente de los triptofanos es más hidrofóbico que en el estado nativo. "B" no muestra el pico a 250 nm característico, obtenido por DC en el UV cercano, que corresponde a la ionización de las tirosinas de la cadena, lo que indica que el ambiente de éstas es hidrofóbico. Este trabajo no solo reporta la existencia de un glóbulo fundido, o dos estados con características semejantes a éste, sino que señala la importancia de las interacciones hidrofóbicas en la formación de estos dos estados a partir del estado desnaturalizado, así como en la transformación al estado nativo (9).

En esta proteína, la lisozima, el uso de fluorescencia intrínseca, de un inhibidor competitivo unido a una sonda fluorescente (para monitorear el desarrollo de los cambios conformacionales del sitio activo), así como el uso del ANS y la comparación con resultados obtenidos por DC en el UV cercano y lejano, NMR e intercambio deuterio-hidrógeno permitieron monitorear estos cambios tanto del núcleo hidrofóbico como las interacciones entre los dos dominios.

Los resultados que se obtuvieron señalaron que ocurre un colapso hidrofóbico en las especies que se forman durante los primeros milisegundos de su renaturalización y que pueden observarse dos intermediarios. El primero, parcialmente colapsado, con estructura secundaria pero sin interacciones terciarias estables. El segundo, con una estructura con el dominio de hélice α estable pero el dominio β inestable y fluctuante. El empaquetamiento laxo de los estados de glóbulo fundido favoreció la unión de ANS y el intermediario de la fase temprana presentó mayor unión a ANS que el intermediario de la fase tardía (10). En otros trabajos se ha caracterizado la estabilidad conformacional del glóbulo fundido y el estado nativo en el citocromo C de caballo y la dihidrofolato reductasa de *E. coli*. En ellos se detectó también el desarrollo de superficies no polares durante el plegamiento por incremento de la fluorescencia del ANS en los primeros 5 milisegundos, que indica que el primer intermediario detectable tiene superficies hidrofóbicas capaces de unir esta molécula (11).

La caracterización del glóbulo fundido de la glutaminil-tRNA sintetasa de *E. coli* por desnaturalización con urea muestra la existencia de este intermediario a bajas concentraciones de este agente. La fluorescencia en el estado nativo es igual al control de ANS en ausencia de proteína. A 2 M de urea, la fluorescencia del ANS aumenta hasta un máximo y va disminuyendo a 3.5 M de urea (12).

Una de las incertidumbres que presentaba el uso de ANS era que la interacción fluoróforo-proteína pudiera deberse no sólo a los grupos hidrofóbicos de la proteína, sino también a fuerzas electrostáticas (ya que el ANS tiene un grupo sulfonilo), o a que la molécula pudiera unirse a grupos hidrofóbicos individuales que no están involucrados en un grupo hidrofóbico o con estructura secundaria. Esto se aclaró permitiendo que el ANS se uniera a homopolipéptidos sin cadenas laterales hidrofóbicas como el políacido glutámico y la polilisina. El primero mostró una conformación "alazar" a pH neutro y alcalino (condiciones en que tienen carga negativa). La polilisina (cargada positivamente a pH neutro y ácido) presenta esta misma estructura. El seguimiento de la fluorescencia del ANS al unirse a estos homopolipéptidos mostró que la fluorescencia depende de la presencia de grupos cargados positiva o negativamente. La polilisina en conformación de hélice α no presenta gran afinidad por el ANS, pero en conformación de β plegada sí une ANS con mayor afinidad. Estos resultados mostraron que ni la confor-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mación "al azar" ni la de hélice α presentan unión por ANS, mientras que la estructura de β plegada, por ser más hidrofóbica, une ANS aún en ausencia de cadenas laterales hidrofóbicas (7).

CONCLUSIONES

El plegamiento de las proteínas a partir de una secuencia primaria hasta una estructura tridimensional con actividad catalítica, es uno de los problemas de mayor interés para la bioquímica. La inmensa cantidad de conformaciones que potencialmente podría adoptar una proteína y el tiempo real en que sucede el proceso de plegamiento elimina la posibilidad de que éste sea al azar. Se ha propuesto entonces, que este proceso de plegamiento esté dirigido y que existan intermediarios cinéticamente accesibles. Por lo tanto, la identificación

de los glóbulos fundidos durante la renaturalización de una proteína es muy importante.

Aunque no se conoce exactamente por qué el ANS fluoresce al unirse a las regiones hidrofóbicas, esta molécula tiene las características espectroscópicas y el comportamiento en diferentes solventes polares que lo hacen una prueba fluorogénica excelente de unión a este tipo de regiones. El aumento en la intensidad de fluorescencia al unirse a intermediarios parcialmente plegados, así como la fluorescencia mínima al unirse al estado nativo o desnaturalizado, permitieron concluir que la medición de los cambios de fluorescencia del ANS constituye una prueba sencilla para identificar intermediarios con las características de un glóbulo fundido. El ANS o el bis-ANS, también han servido para identificar cambios conformacionales en los que

TABLA I

PROTEINA	TECNICAS UTILIZADAS	RESULTADOS
Ahidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (6).	Estudios de conaturalización seguidos por DC y fluorescencia del ANS.	Identificación de una estructura con características semejantes a un glóbulo fundido.
Ahidrasa carbónica de bovino y de humano, β -lactamasa de <i>S. aureus</i> (7).	Estudios de desnaturalización por fluorescencia de ANS.	Identificación de un glóbulo fundido. Observación importante: las conformaciones nativa y desnaturalizada no une ANS.
β -lactamasa de <i>S. aureus</i> , α -lactalbúmina de humano, β -lactoglobulina de bovino, fosfoglicoxato cínasa de levadura, anhidrasa carbónica de bovino (8).	Estudios de desnaturalización siguiendo la intensidad de fluorescencia del ANS. Seguimiento de la formación de estructura secundaria por DC.	La velocidad del incremento en la intensidad de fluorescencia del ANS corresponde a la compactación de las proteínas medida por DC.
β -lactamasa (9).	Desnaturalización por variación de pH y fuerza iónica. Seguimiento de señales de DC en UV cercano y lejano, fluorescencia intrínseca y unión de ANS.	Identificación de dos estados intermediarios "A" y "B" que unen ANS. "A" presenta estructura secundaria semejante a la nativa y "B" es un intermediario más compacto.
Lisozima (10).	Estudios de desnaturalización siguiendo fluorescencia intrínseca, unión de inhibidor competitivo unido a una sonda fluorescente, DC en UV cercano y lejano, NMR, y uso de ANS.	Durante los primeros milisegundos ocurre un colapso hidrofóbico, existen dos intermediarios, uno de fase temprana que tiene mayor afinidad por ANS que el de la fase tardía.
Glutaminil-tRNA sintetasa de <i>E. coli</i> (11).	Desnaturalización con urea siguiendo la intensidad de fluorescencia del ANS.	A 2M de urea se observa un máximo de emisión de fluorescencia de ANS. No así en la conformación nativa, que tiene el mismo valor que el ANS control en ausencia de proteína.
Proteína transportadora de D-galactosa -H' de <i>E. coli</i> (13).	Seguimiento de cambios en la fluorescencia de ANS para seguir la unión de azúcares y antibióticos en la proteína transportadora.	Los azúcares transportados aumentan la fluorescencia del ANS. Aquellos que se unen a la proteína pero no son transportados solo provocan un pequeño aumento, al igual que inhibidores que se unen pero no son transportados. Aquellos azúcares que no se unen no provocan ningún cambio.
Proteína de unión a retinol (14).	Seguimiento de señales de DC en el UV cercano y lejano, fluorescencia intrínseca, NMR, calorimetría, viscosidad y unión de ANS.	A pH ácido, la apoproteína presenta características semejantes a la conformación de glóbulo fundido seguido por estas técnicas.
Hemaglutinina del virus de la influenza (15).	Móntoreo del cambio conformacional de la hemaglutinina usando bis-ANS.	La hemaglutinina sufre un cambio conformacional a bajo pH y deja expuestos sitios hidrofóbicos que no son accesibles a pH neutro. Este cambio provoca un aumento en la intensidad de fluorescencia del bis-ANS.
Homopolipéptidos (7).	Unión de ANS a polilisina y poliacido glutámico a pH neutro, alcalino y ácido.	El ANS no se une a la conformación "al azar" ni a las α -hélices. El ANS une conformaciones más hidrofóbicas como la estructura de β -placada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

existe un estado de glóbulo fundido con una función biológica. Un ejemplo de esto es la proteína simportadora de D-galactosa-H⁺ de *E. coli*. El azúcar provoca un cambio conformacional en la proteína simportadora en el momento de ser transportada; el aumento en la fluorescencia del ANS observado hace pensar que durante el transporte, la proteína adquiere la conformación de glóbulo fundido (13). Otros ejemplos son la liberación de retinol por la holo-RBP (proteína de unión a retinol) (14), que involucra un estado parecido al glóbulo fundido en la proteína cuando libera esta molécula, y la unión del virus de la influenza a los receptores de superficie de las células hospedadoras por mediación de la hemaglutinina, la cual presenta un estado con características semejantes al glóbulo fundido al mediar esta interacción (15). El uso del ANS ha demostrado que el glóbulo fundido no es sólo un intermediario que aparece *in vitro* en los estudios de desnaturalización y renaturalización de diferentes proteínas, sino que probablemente, también se trata de un intermediario funcional importante en algunos procesos biológicos.

AGRADECIMIENTOS

La autora desea agradecer al Dr. Ruy Pérez-Montfort la asesoría y revisión del presente artículo. Al Dr. Daniel Alejandro Fernández-Velasco y al M. en I. B. B. Edgar Vázquez Contreras por la discusión en seminarios y la revisión de este trabajo.

REFERENCIAS

- Creighton TE (1993) *Proteins*. Second Ed WH Freeman & Co New York, pp 287-323.
- Stryer L (1965) The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin: a fluorescent probe of non-polar binding sites, *J Mol Biol* 13:482-495.
- Rosen C-G y Weber G (1969) Dimer formation from 1-anilino-8-naftaleno sulfonate catalyzed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties, *Biochemistry* 8 (10):3915-3920.
- Seale J W, Gorovits B M, Ybarra J y Horowitz P M (1996) Reversible oligomerization and denaturation of the chaperonin GroES, *Biochemistry* 35:4079-4083.
- Dolgikh D A, Gilmanshin R I, Braznikov E V, Bychkova G V, Semisotnov S, Venyaminov Yu y Ptitsyn O B (1981) α -Lactalbumin: Compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS LETTERS* 136(2): 311-315.
- Semisotnov G V, Rodionova N A, Kutysenko V P, Ebert B, Blanck J y Ptitsyn O B (1987) Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B, *FEBS LETTERS* 224 (1):9-13.
- Semisotnov G V, Rodionova N A, Razgulyaev O I, Uversky V N, Gripas A F, y Gilmanshin R I (1991) Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe, *Biopolymers* 31: 119-128
- Ptitsyn O B, Pain R H, Semisotnov G V, Zerovnik E y Razgulyaev O I (1990) Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding, *FEBS LETTERS* 262(1):20-24.
- Goto Y y Fink A L (1989) Conformational states of β -lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt, *Biochemistry* 28: 943-952.
- Itzhaki L S, Evans P A, Dobson C M, y Randford S E (1994) Tertiary interactions in the folding pathway of hen lysozyme: kinetic studies using fluorescent probes, *Biochemistry* 33: 5212-5220.
- Jones B E, Jennings P A, Pierre R A y Matthews R (1994) Development of nonpolar surfaces in the folding of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase detected by 1-anilino naphthalene-8-sulfonate binding, *Biochemistry* 33:15-250-15258.
- Das B K, Bhattacharyya T, y Roy S. (1995) Characterization of a urea induced molten globule intermediate state of glutamyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 34: 5242-5247.
- Walmsley A R, Martin G E M y Henderson P J F (1994) 8-anilino-1-naphthaleno sulfonate is a fluorescent probe of conformational changes in the D-galactose-H⁺ symport protein of *Escherichia coli*, *J Biol Chem* 269 (25): 17009-17019.
- Bychkova V E, Berni R, Rossi G L, Kutysenko V y Ptitsyn O B (1992) Retinol-binding protein is in the molten globule state at low pH, *Biochemistry* 31: 7566-7571.
- Korte T y Herrmann A (1994) pH-dependent binding of the fluorophore bis-ANS to influenza virus reflects the conformational change of hemagglutinin, *Eur Biophys J* 23: 105-113.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of Intermediates and Insight into the Denaturation Pathway Using Tryptophan Mutants¹

María Elena Cháñez-Cárdenas,* D. Alejandro Fernández-Velasco,† Edgar Vázquez-Contreras,‡ Roberto Coria,§ Gloria Saab-Rincón,¹ and Ruy Pérez-Montfort*²

*Departamento de Bioquímica; §Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular; †Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina; and ‡Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México; and ¹Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62250 Cuernavaca, Mor. México

Received September 25, 2001, and in revised form December 10, 2001; published online February 15, 2002

The unfolding of triosephosphate isomerase (TIM) from *Trypanosoma brucei* (TbTIM) induced by guanidine hydrochloride (GdnHCl) was characterized. In contrast to other TIMs, where unfolding is a two or three state process, TbTIM showed two intermediates. The solvent exposure of different regions of the protein in the unfolding process was characterized spectroscopically with mutant proteins in which tryptophans (W) were changed to phenylalanines (F). The midpoints of the transitions measured by circular dichroism, intrinsic fluorescence, and catalytic activity, as well as the increase in 1-aniline 8-naphthalene sulfonate fluorescence, show that the native state was destabilized in the W12F and W12F/W193F mutants, relative to the wild-type enzyme. Using the hydrodynamic profile for the unfolding of a monomeric TbTIM mutant (RMM0-1TIM) measured by size-exclusion chromatography as a standard, we determined the association state of these intermediates: D*, a partially expanded dimer, and M*, a partially expanded monomeric intermediate. High-molecular-weight aggregates were also detected. At concentrations over 2.0 M GdnHCl, the hydrodynamic properties of TbTIM and RMM0-1TIM are the same, suggesting that the dimeric intermediate dissociates and the unfolding proceeds

through the denaturation of an expanded monomeric intermediate. The analysis of the denaturation process of the TbTIM mutants suggests a sequence for the gradual exposure of W residues: initially the expansion of the native dimer to form D* affects the environments of W12 and W159. The dissociation of D* to M* and further unfolding of M* to U induces the exposure of W170. The role of protein concentration in the formation of intermediates and aggregates is discussed considering the irreversibility of this unfolding process. © 2002 Elsevier Science (USA)

Key Words: triosephosphate isomerase; folding intermediate; site-directed mutagenesis; tryptophan; fluorescence; spectroscopy; circular dichroism; size-exclusion chromatography; aggregation; irreversibility.

¹ This work was supported by DGAPA, UNAM Grants IN 206297 and IN 200600 (R.P.-M.) and IN 112198 (D.A.F.-V.) and PAEP, UNAM Grant 201403 (M.E.C.-C.).

² To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70242, 04510 México D.F., México. Fax: (52) 5622 5630. E-mail: rmontfor@fisiol.unam.mx.

Protein folding studies involve the thermodynamic, kinetic, and structural characterization of the native, unfolded, and intermediate states of proteins. These states have been studied by protein engineering and biophysical techniques (1, 2). Unfolding transitions induced by urea, guanidine hydrochloride (GdnHCl), temperature, or pressure have been used to estimate the conformational stability of proteins (3). The reversibility of these reactions is a necessary requirement for the thermodynamic analysis of the folding process.

Although many proteins are oligomers, most denaturation studies have been performed with monomeric proteins. Oligomeric proteins tend to have more complex denaturation processes, in which precipitation and/or aggregation lead to partial or complete irrevers-

ibility of the process (4–6). Aggregation is frequently present in both *in vitro* and *in vivo* folding and increases at high protein concentrations. It has been reported for human carbonic anhydrase II (7) and staphylococcal nuclease (8), among others, that protein aggregation is associated with the presence of partially folded intermediates (9). Homodimers such as triosephosphate isomerase (TIM)³ are the simplest models of oligomeric proteins. TIM catalyzes the interconversion of D-glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate in the glycolytic pathway. The catalytic properties of TIM have been studied in detail and the enzyme has been considered a perfect catalyst (10). The three-dimensional structure of TIM from 11 species has been reported, including the TIM from prokaryotes (11–15), unicellular eukaryotes including several parasites (16–20), and multicellular eukaryotes including man (21, 22). The tertiary folding pattern of TIM is the prototype of the $\alpha\beta$ barrel structure. Each monomer is approximately 250 residues long and contains a complete active site, located near the interface shared by both subunits. These subunits associate through noncovalent interactions and the enzyme is active only in its oligomeric state (23–29). All the wild-type (wt) TIMs studied so far are homodimers, with the exception of those from *Pyrococcus woesei* and *Methanothermobacter fervidus*, which are homotetramers (30).

A variety of spectroscopic techniques have been used to characterize the unfolding of homologous TIMs. Intrinsic fluorescence of the protein has often been used to follow the exposure of aromatic residues that occurs during the dissociation and/or unfolding induced by urea (28, 31–33) or GdnHCl (32–36). All the TIMs used in these studies are enzymes with multiple tryptophans (W). These residues can be used as very sensitive probes to monitor conformational changes in protein folding, but the presence of more than one W residue gives information on the average properties of different regions of the molecule and limits the interpretation of fluorescence data. Sometimes, this limitation can be solved by replacing W residues with other aromatic but less fluorescent amino acids, i.e., phenylalanine (F) or tyrosine (Y) (37).

³ Abbreviations used: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DTT, dithiothreitol; TED, buffer containing triethanolamine, EDTA, and DTT; ANS, 1-aniline 8-naphthalene sulfonate; CD, circular dichroism; SCM, spectral center of mass; IF, intrinsic fluorescence; SEC-FPLC, size-exclusion chromatography-fast pressure liquid chromatography; TIM, triosephosphate isomerase, TbTIM and yTIM, triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and yeast, respectively; W12F, W159F, and W12F/W193F, mutants of TbTIM in which tryptophans 12, 159, and 12 and 193 are substituted by phenylalanine, respectively; wt, wild type; R, Stokes radius; F, phenylalanine; W, tryptophan; A, aggregates; D, native dimer; D*, partially expanded dimer; M*, monomeric intermediate; U, unfolded monomer.

The structure and characterization of dimeric and monomeric mutants of TIMs from *Trypanosoma brucei* (TbTIM) have been studied (25–27, 29), but there are no reports dealing with wt TbTIM unfolding. TbTIM has five W residues at positions 12, 90, 159, 170, and 193. In this work, the denaturation induced by GdnHCl of wt TbTIM and the W12F and W12F/W193F mutants was studied. The transitions were followed by intrinsic fluorescence, circular dichroism, catalytic activity, 1-aniline 8-naphthalene sulfonate (ANS) binding, and size-exclusion chromatography (SEC). One of the designed mutants (W12F/W193F) has the same number of Ws as TIM from *Saccharomyces cerevisiae* (yTIM) and in equivalent positions. This allowed a comparison by intrinsic fluorescence, of the denaturation pattern of yTIM and TbTIM. In addition, the single mutants W12F and W159F were constructed to analyze the contribution of these Ws to the fluorescence spectrum of the native protein. Analysis of the fluorescence data obtained for the three mutants provided information on how the different regions of TbTIM are exposed during the unfolding process. In addition, we show that in GdnHCl, TbTIM follows a complex and irreversible denaturation process that involves dimeric and monomeric intermediates that are prone to aggregation. The high-molecular-weight aggregates detected by SEC-fast pressure liquid chromatography (FPLC) may account for the irreversibility of the transitions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

TbTIM Gene

The TbTIM gene was a kind gift of Dr. P. A. M. Michels (Research Unit for Tropical Diseases, ICP-TROP, Brussels, Belgium).

Construction of Mutant Enzymes

Substitution of W residues by F at positions 12, 159, and 193 was achieved by site-directed mutagenesis with the polymerase chain reaction (PCR) using the Expand high-fidelity PCR system (Boehringer) and the following forward and reverse oligonucleotides, respectively: W12F mutant, 5'-ATCGCAGCAGCCAACTCAAGTGCACCGC-3' and 5'-GCCCTTGCACTTGAAGTTGCTGCTGCCAT-3'; W159F mutant, 5'-CTGAAGAAGGCTCACTTCCGCAAAAGTTGTCATC-3' and 5'-GATGACAACCTTGGCGAAGTCAGCCTTCTTCAG-3'; And W193F mutant, 5'-GCACCTCATCCGAGCTTCGTGAGCAGCAAGATT-3' and 5'-AATCTTGCTGCTACCAAGCTGCCGATGACTGC-3'. For the three mutants, the T7 promoter and T7 terminator oligonucleotides (Novagen pET System) were also used.

PCR products were cloned in the pET3a vector and BL21(DE3)pLysS cells (Novagen) were transformed with them. Complete genes were sequenced. The double mutant W12F/W193F was constructed as follows: pET3a-W12F and pET3a-W193F were digested using *KpnI* and *BamHI*. In both plasmids, two fragments of 5161 and 490 bp were obtained. The fragments of 5161 bp from W12F and of 490 bp from W193F were purified using the GeneClean system (Bio 101). These two fragments were ligated and used to transform BL21(DE3) pLysS cells. Complete sequence of this construction confirmed the mutation of residues W12 and W193 to F.

The monomeric mutant RMMO-ITIM was obtained using a directed evolution scheme over the MonoTIM gene (38). MonoTIM is a

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

monomeric mutant of TbTIM constructed by Wierenga's group, where a fragment of the interface region of TbTIM (IAKSGAFT-GEVSLPI) was replaced by a shorter and more hydrophilic sequence (GNADALAS) (26). RMMO-1TIM was obtained after randomization of the MonoTIM gene and selection for active mutants. RMMO-1TIM had the following additional substitutions S43P, T44A, and A179T; behaved as a monomer; and had a k_{cat} 1 order of magnitude higher than that of MonoTIM (38).

Overexpression and Purification of Recombinant Proteins

BL21(DE)3 pLysS strains expressing TbTIM and the three mutants were grown at 37°C in Luria-Bertani medium supplemented with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin and 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol. Cultures were induced at $A_{600} = 0.8$ –1.0 by addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside at a final concentration of 0.4 mM. Growth was continued overnight. The purification of TbTIM and the mutants was performed as described by Borchert *et al.* (25). Due to differences in the isoelectric point of TbTIM and the TIM from *E. coli*, this protocol eliminates the latter enzyme. SDS-PAGE of purified fractions of TbTIM and the mutants showed a single band when stained with Coomassie blue or silver. RMMO-1TIM was overexpressed and purified as described previously (38).

Protein Characterization

Protein concentration of TbTIM and the mutants was determined by the BCA protein assay (Pierce) and confirmed by absorbance measurements. The molar absorption coefficients calculated according to Pace *et al.* (39) were $\epsilon(280) (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) = 1.308$ for TbTIM, 0.896 for W12F/W193F, and 1.102 for W12F and W159F.

TIM activity was followed by the change in absorbance at 340 nm due to oxidation/reduction of NADH/NAD⁺ in a coupled-enzyme assay at 25°C.

Activity in the direction for glyceraldehyde 3-phosphate was measured at 25°C as described (25). Reaction conditions were 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, 1 mM DTT (TED 100/10/1), pH 7.4, 0.025–2.5 mM glyceraldehyde 3-phosphate, 5–10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ α -glycerol-phosphate dehydrogenase, and 0.2 mM NADH.

Fluorescence and Circular Dichroism Spectra for TbTIM and the W12F, W159F, and W12F/W193F Mutants

Native TbTIM and the three mutants were incubated at 25°C in TED 20/1/1 (20 mM triethanolamine, 1 mM EDTA, 1 mM DTT), pH 7.4, at a protein concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Fluorescence spectra were obtained after excitation at 295 nm (slitwidth = 1 nm) following the emission from 310 to 400 nm (slitwidth = 0.5 nm) using an ISS PCI photon counting spectrofluorometer (ISS, Urbana, IL). The wavelength of maximum intensity for all the native enzymes was 322 nm. Samples for circular dichroism (CD) spectra were prepared with 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of TIM in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, and filtered. CD spectra were obtained in an AVIV 62 HDS spectropolarimeter, using a 0.1 cm cell at 25°C. Ellipticity was recorded from 190 to 240 nm, scanning with a bandwidth of 1 nm and repeating five times. Reference samples without protein were subtracted in all cases. Protein concentration was determined for the filtered samples in order to calculate the molar ellipticity. Analysis of the α helix content of CD spectra was performed using the CDNN (40) and CDstr (41) programs.

GdnHCl Unfolding Experiments Monitored by Fluorescence and Circular Dichroism

All denaturation experiments were performed incubating 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TIM at 25°C in TED 20/1/1, pH 7.4, for 48 h. Experimentally we

found that at this time all measured signals had a minimum variation. Unless otherwise stated, 48 h will be referred to as the incubation time. GdnHCl concentration was increased from 0 to 6.0 M. The ellipticity changes were monitored at 222 nm with the spectropolarimeter using 0.1-cm thermoregulated cells at 25°C. The corresponding fluorescence measurements were made with the ISS spectrofluorometer at 25°C using an excitation wavelength of 295 nm (slitwidth = 1 nm) and following the emission at 322 nm (maximum signal for the native enzymes). The spectral center of mass (SCM) of each spectrum defined as

$$\text{SCM} = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)} \quad [1]$$

was calculated with the ISS software. In Eq. [1] $I(\lambda)$ is the fluorescence intensity at wavelength λ .

Reference samples at each denaturant concentration were subtracted from all the experimental CD or fluorescence measurements.

ANS Fluorescence

Fluorescence measurements of ANS were performed as follows: 100 μM ANS was added to each sample with or without protein under exactly the same conditions mentioned above. Excitation wavelength was 360 nm and the emission wavelength range was 400–560 nm. Reference spectra with ANS and without protein were subtracted in all cases.

Catalytic Activity Measurements of Samples Incubated in GdnHCl

The same samples used for spectroscopic measurements were also used to measure catalytic activity. In order to avoid the effect of denaturants on α -glycerol-phosphate dehydrogenase, the coupling enzyme in TIM activity measurements, samples were diluted. This dilution is also necessary because catalytic activity measurements are carried out at a concentration of 5 ng mL^{-1} (i.e., a concentration 10,000 times lower than that used in the denaturation experiments). The protocol was as follows (33): TIM samples (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were incubated in TED 20/1/1, pH 7.4, for the incubation time in GdnHCl at different concentrations. Subsequently, samples were diluted to 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of TIM maintaining the original denaturant concentration (step 1); thereafter samples were transferred to the catalytic activity medium (step 2) (2S). Measurements were performed with 5 ng mL^{-1} of TIM and less than 6 mM GdnHCl. These drastic changes in denaturant and protein concentration should modify the interconversion between native dimer and intermediates or unfolded forms of the protein. The effect of step 1 on the fraction of active molecules was tested by modifying both the length of the incubation from 10 s to 1 min and the concentration of TbTIM from 1 to 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the dilution step, and no significant effect was noticeable (data not shown). Regarding step 2, the estimated reassociation half-time is in the order of hours at the low concentrations of TbTIM used for the catalytic assays (42). If reassociation occurred, it should be apparent as a downward curvature of the readings during the catalytic assay and dissociation should produce an upward curvature. However, NADH oxidation measurements yielded straight lines indicating that significant reassociation or dissociation did not take place during catalytic assays. These observations support the idea that the ratio between active and inactive molecules is not perturbed during the assay.

Reversibility Assays

Denaturation of TbTIM (2.0–5.0 mg mL^{-1}) was performed in TED 20/1/1, pH 7.4, and increasing concentrations (0 to 6.0 M) of GdnHCl. Samples were incubated in denaturant at 25°C for the incubation



time. Thereafter, the samples were diluted in TED 20/1/1, pH 7.4, to 2–50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TbTIM and 60 mM GdnHCl and allowed to renature for 24 h. Fluorescence intensity and catalytic activity of the renatured samples were determined as described above, except that the excitation and emission wavelengths for the fluorescence measurements were 280 and 320 nm, respectively.

Size-Exclusion Chromatography and Stokes Radius Determination

SEC was performed in an FPLC system (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using a Superdex 75 column. Protein elution was monitored simultaneously following the absorbance at 280 nm (with a UV-MII variable wavelength detector) and the intrinsic fluorescence (using a Waters 474 scanning fluorescence detector, excitation wavelength 280, emission wavelength 320 nm).

Calibration. Stokes radii were calculated from elution volumes and a calibration curve obtained as described by Uversky (44). The proteins used for the construction of the calibration curve were transferrin, bovine serum albumin, ovoalbumin, carbonic anhydrase, chymotrypsinogen, myoglobin, ribonuclease, lysozyme, cytochrome c, and insulin. One-hundred microliters of each sample (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in TED 100/10/1, pH 7.4, or in 6 M GdnHCl, TED 100/10/1, pH 7.4) was injected into the Superdex 75 column, previously equilibrated in the buffer or buffer-GdnHCl solutions respectively, at a flow rate of 0.4 mL min^{-1} . The calibration curve was constructed using the experimentally determined elution volumes and the Stokes radii values reported for these proteins in native and denaturing conditions (43).

In accordance with data obtained for a Superose 12 column (43), our data showed that the permeation properties of the Superdex 75 column are practically independent of denaturant concentration; thus, a single plot of migration rate ($1000/V_e$) vs Stokes radius (R_s) was used. The following linear equation

$$1000/V_e = 1.493R_s + 48.1 \quad [2]$$

fits the 30 fluorescence points used in the calibration curve with a correlation coefficient of 0.9734.

Experimental samples. One-hundred microliters of TbTIM or RMMO-TbTIM (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) incubated for 48 h at different GdnHCl concentrations was injected into the Superdex 75 column previously equilibrated at the same concentration of GdnHCl and analyzed according to the calibration curve.

Solvent Exposure and Distances between Tryptophan Residues in TbTIM

Solvent-accessible surface areas of W side chains were calculated by means of the program NACCESS (Simon Hubbard, University College, UK), an implementation of the Lee and Richards algorithm (44) using a probe radius of 1.4 Å and a slab width of 0.1 Å. Values of solvent exposure are expressed as percentages of the accessible area of the side chain of the tripeptide AWA in extended conformation. The coordinates used for TbTIM were those of 5TIM (17). The distances between different W residues of 5TIM were measured using the Swiss PDB Viewer ver.3.7b2 program (EXPASY, Switzerland).

Calculation of C_{α} Values

C_{α} values were calculated using the program Savuka ver. 5.12 (45) dividing ΔG for each transition by A (cooperative factor). Both values were calculated assuming a three-state model, since only two transitions were observed by CD, intrinsic fluorescence (IF), or catalytic activity; i.e., the transition of partially unfolded dimer to monomeric intermediate (transition of D^* to M^* , see Results) is not

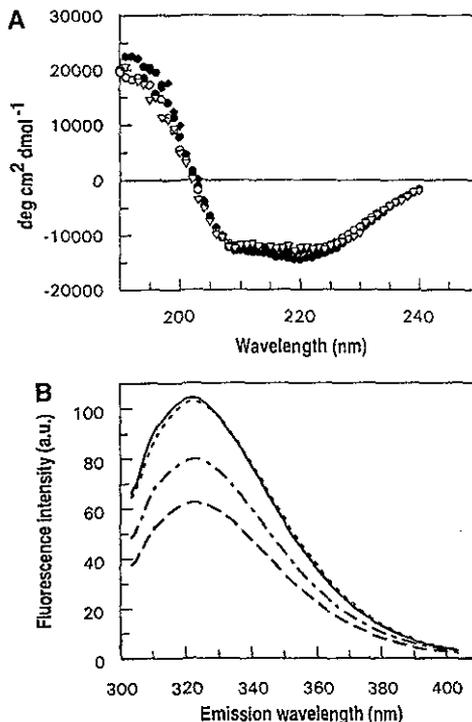


FIG. 1. Spectroscopic properties of TbTIM and mutant proteins. (A) Circular dichroism spectra of TbTIM (●), W12F (○), W12F/W193F (▽), and W159F (◆) in 10 mM phosphate buffer pH 7.4. (B) Intrinsic fluorescence emission spectra of W12F (---), W159F (-.-), W12F/W193F (-.-), and TbTIM (—). Fluorescence spectra were obtained at a concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TIM in TED 20/1/1, pH 7.4 (excitation wavelength 295 nm).

clearly resolved from the unfolding of the monomeric intermediate (transition of M^* to U) by these techniques.

RESULTS

Catalytic and Spectroscopic Properties of TbTIM and the W12F, W159F, and W12F/W193F Mutants

TbTIM and the TbTIM mutants were purified to homogeneity. SDS-PAGE analysis of all the proteins showed a single 27-kDa band on gels stained with either Coomassie blue or silver. The far UV CD spectra of the native enzyme and the three mutants were very similar (Fig. 1A). These spectra were also analyzed using the CDNN (40) and CDSstr (41) programs. Both methods of analysis indicated that TbTIM and the mutants in their native state had markedly similar secondary structures with an α helix content of 40.3% for the wt enzyme and of 39.6, 39.8, and 37.8 for the

TABLE I
Catalytic and Fluorescence Properties of TbTIM and Mutant Proteins^a

Enzyme	K_m (G3P) (mM)	k_{cat} (G3P) (min^{-1})	Position of remaining W	λ_{max} (nm)	SCM ^b
TbTIM	0.20	0.87×10^5	12, 90, 159, 170, 193	322	336.7
W12F	0.34	0.76×10^5	90, 159, 170, 193	322	336.8
W12F/W193F	0.65	1.12×10^5	90, 159, 170	322	337.3
W159F	0.28	1.07×10^5	12, 90, 170, 193	322	336.7

^a Catalytic parameters were determined as described under Experimental Procedures. Fluorescence parameters were determined from spectra taken with excitation wavelength at 295 nm and emission wavelengths from 310 to 400 nm.

^b SCM, spectral center of mass.

W12F, W159F, and W12F/W193F mutants, respectively. The catalytic parameters are also very similar in the mutants and in TbTIM (Table I), indicating that no major changes occurred with the mutations.

The intrinsic fluorescence spectra of all four proteins also exhibited the same λ_{max} (322 nm) and a very similar SCM (Table I).

The intrinsic W emission spectra of TbTIM and the three mutants are shown in Fig. 1B. All the mutants had W to F substitutions; therefore, in the absence of quenching effects, a decrease in quantum yield should be observed in all the mutants. Indeed, the fluorescence spectrum of W12F shows a 40% decrease in intensity (at λ_{max}), when compared with TbTIM (Fig. 1B). In contrast, the removal of a second W in W12F/W193F shows only a 20% decrease in intensity when compared with TbTIM; i.e., the quantum yield of W12F/W193F is higher than that of W12F (Fig. 1B). This result suggests that W193 is quenching a nearby W residue.

The percentages of solvent accessible surface area of W residues in native TbTIM (5TIM (17)) are 0.2% for W12, 2.5% for W159, 3.8% for W170, 9.5% for W90, and 18.6% for W193. The distances between $C\alpha$ of W193 and $C\alpha$ of the other W residues in TbTIM are W193-W12, 33.0 Å; W193-W90, 20.2 Å; W193-W170, 22.3 Å; and the shortest distance calculated for the pair W193-W159 is 6.1 Å. This points to W193 as a putative quencher of nearby W159. In accordance, TbTIM and the W159F mutant have essentially identical emission spectra (Fig. 1B), suggesting that W159 makes no contribution to the intrinsic fluorescence spectra of native TbTIM due to the quenching effect of W193. This hypothesis could not be corroborated with the W193F mutant (where an increase in quantum yield should be observed), because any attempt to overexpress and purify the W193F mutant protein was unsuccessful. Figure 2 shows the location of the five W residues in TbTIM.

GdnHCl-Induced Unfolding of TbTIM and the W12F and W12F/W193F Mutants

Reversibility. Samples were incubated in GdnHCl for 48 h. They were then diluted in buffer without

GdnHCl to allow renaturation, and 24 h later, their catalytic activity and intrinsic fluorescence were determined (Fig. 3). At concentrations below 1.0 M GdnHCl in the denaturation step, the reversibility of the unfolding of TbTIM was nearly 100%. Between 1.0 and 2.0 M GdnHCl, catalytic activity and λ_{max} were not recovered; and finally, partial reversibility was observed in samples incubated at higher concentrations of GdnHCl (4.0 to 6.0 M) (Fig. 3). The percentage of renaturation decreases as the protein concentration increases from 2 to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 3), suggesting that aggregation takes place during the unfolding incubation period.

Circular dichroism. The unfolding of W12F, W12F/W193F, and TbTIM after incubation for 48 h in GdnHCl was followed by far UV CD. Changes in ellipticity at 222 nm were used to determine the apparent fraction of molecules in the native state (F_{app}) (Fig. 4). These patterns show nonmonophasic behavior, indicat-

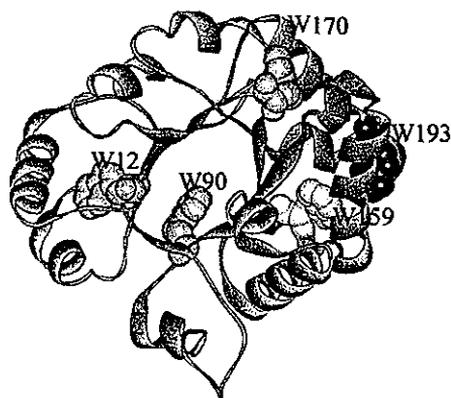


FIG. 2. Diagram of a monomer of wt TbTIM showing the position of the five W residues. W12, W90, and W170 are located in loop 1, β strand 4, and the catalytic loop (loop 6), respectively, and are shown in gray. W193 is in α helix 6 and is shown in black. This last residue is exposed to solvent and quenches the fluorescence of W159 located in a short 3_{10} helix before β strand 6, shown in light gray. The coordinates for the diagram were taken from the PDB file 5TIM (17).

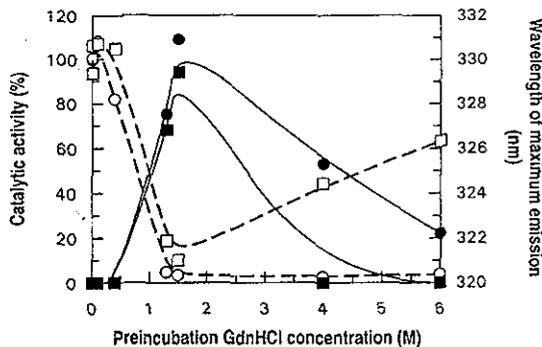


FIG. 3. Reversibility of the unfolding of TbTIM. Recovery of catalytic activity and fluorescence λ_{\max} as a function of GdnHCl preincubation concentration. Catalytic activity (open symbols, dashed lines) and fluorescence λ_{\max} (closed symbols, continuous line) were measured 24 h after denaturant dilution of samples incubated 48 h at the indicated denaturant concentrations (see Experimental Procedures). Two different concentrations of TIM were used: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (circles) and $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (squares).

ing the presence of a folding intermediate. Between 1.0 and 2.0 M GdnHCl changes in ellipticity are small; i.e., there is a plateau region in the CD signal. The CD spectra of TbTIM without denaturant and of samples incubated in 1.2, 1.4, and 1.8 M GdnHCl were compared using the CDNN (40) and CDSstr (41) programs. This analysis shows that the α helix content decreases by nearly 50% between 1.0 and 1.8 M GdnHCl. In the case of the W12F and W12F/W193F mutants, the native state is destabilized with respect to the wild-type protein, increasing the plateau between the two transitions. The $C_{1/2}$ values for the first transition are smaller in the mutants than in wt TbTIM. In contrast, the $C_{1/2}$ values of the second transition are very similar for the three enzymes, indicating that the more clear-cut plateau region observed with the W12F and W12F/W193F mutants results from the destabilization of the native state (Table II).

ANS binding. ANS binding was also used to correlate the plateau region observed with CD with the presence of an intermediate. It has been reported that ANS binds to folding intermediates that possess hydrophobic areas exposed to solvent. The binding of ANS to these intermediates is accompanied by a large increase in its fluorescence quantum yield (46, 47). Figure 5A shows ANS fluorescence in the presence of W12F, W12F/W193F, and TbTIM, after 48 h of incubation with different concentrations of GdnHCl. All the proteins reached maximal ANS fluorescence at concentrations that ranged between 1.0 and 2.0 M GdnHCl suggesting the presence of at least one intermediate; this concentration range corresponds to the plateau region detected by CD. In accordance, the range of denaturant

concentration where high ANS binding was observed increased in the order $\text{TbTIM} < \text{W12F} < \text{W12F/W193F}$ (compare Figs. 4 and 5A). It is also noted that ANS intensity is higher for W12F/W193F than for W12F and TbTIM (Fig. 5A), suggesting the exposure of a higher hydrophobic surface in the intermediate state(s) for the W12F/W193F mutant or alternatively a higher fraction of molecules in this (these) state(s).

Catalytic activity. Catalytic activity was determined using a concentration of 5 ng mL^{-1} of TIM; therefore, the samples used for spectroscopic measurements (at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) had to be diluted. A detailed protocol was used (33) to determine the effect of dilution on the ratio between the native dimer and the intermediates or unfolded forms of the protein (see Experimental Procedures). Figure 5B shows the catalytic activity of TIM after incubation of the proteins in GdnHCl. In agreement with the data obtained by CD, the W12F/W193F mutant loses its catalytic activity at a lower concentration of denaturant ($C_{1/2} = 0.75 \text{ M}$) than the W12F mutant ($C_{1/2} = 0.82 \text{ M}$) or TbTIM ($C_{1/2} = 1.08 \text{ M}$) (Table II). Since catalytic activity of TIM has been attributed to the native dimer (24), this result indicates a decrease in the stability of the native state in the W12F and W12F/W193F mutants.

Intrinsic tryptophan fluorescence. In the absence of denaturant, the fluorescence emission spectrum of TbTIM shows a λ_{\max} at 322 nm (Table I). The unfolding of TbTIM produced a nonmonophasic shift in the SCM of the emission spectra from 336.7 nm (in the absence of denaturant) to 358 nm (in 6.0 M GdnHCl), indicating the complete exposure of W residues to the solvent

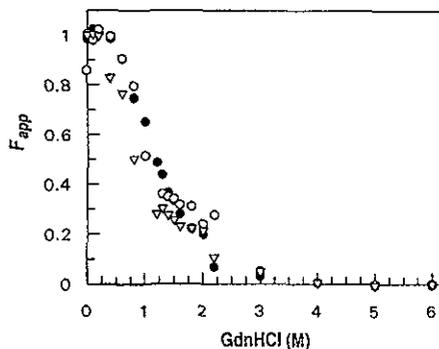


FIG. 4. Far UV circular dichroism of TbTIM and mutant proteins at different concentrations of GdnHCl. The apparent fraction of native molecules (F_{app}) was calculated using the ellipticity values at 222 nm (θ_{222}) obtained for TbTIM (\bullet), W12F (\circ), and W12F/W193F (∇) mutants and the equation $F_{\text{app}} = Y_x - Y_u/Y_n - Y_u$. Measurements were made at protein concentrations of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, after incubation at different concentrations of GdnHCl for 48 h.

TABLE II
The Unfolding of TbTIM Followed by Different Techniques

Techniques	$D \rightleftharpoons D^*$ [GdnHCl] _{1/2}		$D^* \rightleftharpoons 2U$ [GdnHCl] _{1/2}	
Activity [GdnHCl] _{1/2} ^a	wt	1.08	Not detectable	
	W12F	0.82		
	W12F/W193F	0.75		
CD [GdnHCl] _{1/2} ^a	wt	1.0	wt	2.14
	W12F	0.8	W12F	2.43
	W12F/W193F	0.65	W12F/W193F	2.19
SCM [GdnHCl] _{1/2} ^a	wt	1.2	wt	2.2
	W12F	0.9	W12F	2.16
	W12F/W193F	0.7	W12F/W193F	2.22
Fluorescence intensity at λ_{max} [GdnHCl] _{1/2} ^a	wt	1.2	wt	2.2
	W12F	not detected	W12F	2.0
	W12F/W193F	0.69	W12F/W193F	2.2
	$D \rightleftharpoons 2M^*$		$D^* \rightleftharpoons 2M^*$	$2M^* \rightleftharpoons 2U$
SEC-FPLC ^b	wt 0-1.8 M		wt 2.0-2.2 M	wt 2.2-6.0 M

^a $C_{1/2}$ values (M) for catalytic activity (Fig. 5B), intrinsic fluorescence (Figs. 6A and 6B), and CD data (Fig. 4) were calculated using the program Savuka, version 5.12 (45).

^b Concentration ranges were obtained from the data in Fig. 7.

(Fig. 6A). The plateau region observed between 1.2 and 2.0 M GdnHCl shows a SCM near 346 nm for the three enzymes. Just as in the CD data, this plateau was more evident for the W12F/W193F and W12F mutants than for wt TbTIM and the $C_{1/2}$ values for the first transition measured by IF were not equal for the three enzymes (see Table II). These observations suggest that although the native state is destabilized by the W to F mutations, the unfolding process for wt TbTIM and the mutants is conserved.

The effect of GdnHCl on the fluorescence intensity of W12F, W12F/W193F, and wt TbTIM is shown in Fig 6B. The unfolding of the wt enzyme and W12F/W193F mutant show two transitions. The $C_{1/2}$ values calculated using fluorescence intensity data are the same as those obtained from the SCM data (Table II). On the other hand, the first transition is not so evident in the W12F mutant. In fact, the program used to analyze the transitions was unable to calculate its $C_{1/2}$ value. However, Fig. 6B shows a small decrease in intensity (from 10 to 18% of the total change) between 0.6 and 1.4 M GdnHCl that corresponds to the first transition. The second transition in the W12F mutant is clearly observed between 1.4 and 3.0 M GdnHCl and has a $C_{1/2}$ value of 2.0 (Table II). In the absence of denaturant, the differences in intensity of fluorescence between wt TbTIM and the W12F mutant should, in principle, reflect mainly the contribution of W12.

A hypothesis about the gradual exposure of W residues in increasing concentrations of GdnHCl is discussed below (see Discussion).

Hydrodynamic Properties

The unfolding patterns followed by CD showed a plateau region at concentrations between 1.0 and 2.0 M GdnHCl (Fig. 4), where a maximum in ANS binding was also observed (Fig. 5A). These findings indicate the presence of at least one folding intermediate. In order to explore the association state of the intermediate, SEC-FPLC experiments at increasing concentrations of GdnHCl were carried out with TbTIM and with RMMO-1TIM, a monomeric mutant of TbTIM (38). This mutant was derived from the original monoTIM (26; see Experimental Procedures).

The elution profiles of RMMO-1TIM show a single elution peak at all the GdnHCl concentrations tested (data not shown). On the other hand, the elution profiles of TbTIM showed a single elution peak only at concentrations of GdnHCl lower than 0.9 M and higher than 3.0 M. In contrast, more than one elution peak was observed for TbTIM at intermediate denaturant concentrations (between 1.0 and 2.5 M GdnHCl) (see below).

The elution volumes obtained and the calibration curve described under Experimental Procedures were used to calculate R_s values. Figure 7 shows the R_s of TbTIM and RMMO-1TIM as a function of GdnHCl concentration.

In the absence of denaturant, the R_s of the monomeric mutant RMMO-1TIM is 19.9 Å (Figure 7, \diamond). A monophasic transition is observed between 1.0 and 3.0 M GdnHCl, the R_s for the unfolded monomers of RMMO-1TIM is 44.0 Å at 6.0 M GdnHCl (Fig. 7, \diamond).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

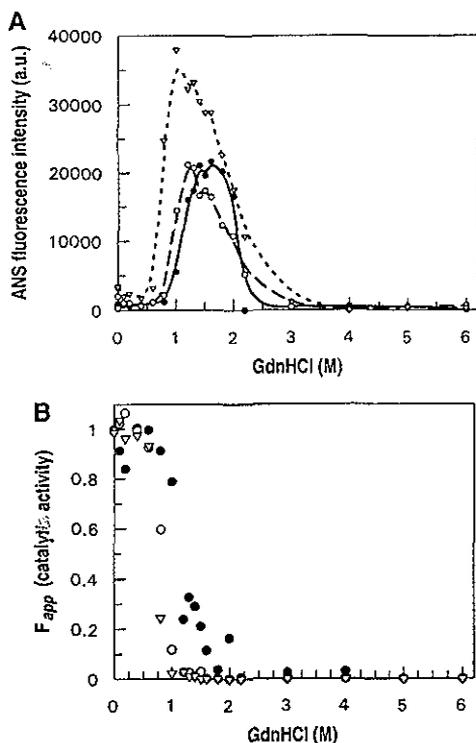


FIG. 5. ANS fluorescence and catalytic activity of TbTIM and mutant proteins at different concentrations of GdnHCl. Samples of TbTIM (●), W12F (○), and W12F/W193F (▽) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) were incubated for 48 h at different concentrations of GdnHCl. (A) $100 \mu\text{M}$ ANS was added and fluorescence intensity was recorded (excitation wavelength 360 nm, emission wavelength 480 nm). (B) Catalytic activity was measured as described under Experimental Procedures and F_{app} was calculated as described in the legend to Fig. 4.

The R_s of native TbTIM (D) is 29.6 Å. In 1.8 M GdnHCl, the R_s of this peak increases to 32.0 Å (Fig. 7, ●). The order of analysis of the samples had no effect on the elution profiles; therefore, the increase in R_s is not caused by adsorption effects. Changes in retention time related to changes in solvent conditions can also be ruled out, because the permeation properties of the column are independent of denaturant concentration (see Experimental Procedures and (43)). The increase in R_s observed between 0 and 1.8 M GdnHCl occurs at concentrations of GdnHCl that coincide with the first transition observed by CD, intrinsic fluorescence, ANS binding, and catalytic activity measurements. We suggest that this transition involves the formation of an intermediate state named D* which is a partially expanded dimeric intermediate. Therefore, the transformation of D to D*, also detected by spectroscopy ($C_{12} =$

1.0–1.2 M GdnHCl; Table II), is accompanied by a complete loss of activity, a 10-nm shift in the SCM, a 50% reduction of secondary structure, and the exposure of hydrophobic regions to the solvent (Figs. 4, 5A, 6A, and 7).

The hydrodynamic properties of D and D* are very similar ($\Delta R_s = 2.4 \text{ \AA}$); therefore, two peaks, with slight differences in elution volume, should be observed. In contrast, only one peak is observed. A similar behavior has been reported in the unfolding of proteins that show "molten globule" intermediates. In these cases, single peaks were obtained in the transition region, since the fast interconversion between states is substantially shorter than the typical time of chromatography experiments (43).

SEC-FPLC experiments show that, between 1.0 and 2.5 M GdnHCl, D* coexists (in a slow exchange) with

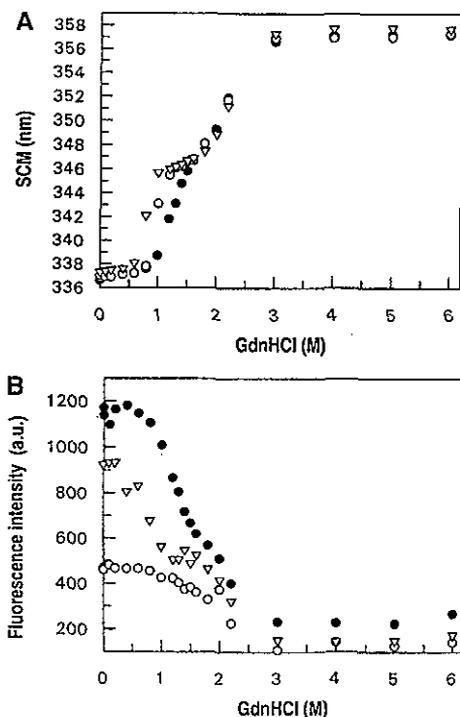


FIG. 6. Intrinsic fluorescence of TbTIM and mutant proteins at different concentrations of GdnHCl. Intrinsic fluorescence spectra (excitation wavelength 295 nm) of TbTIM (●), W12F (○), and W12F/W193F (▽) were carried out after incubation at different concentrations of GdnHCl for 48 h. (A) SCM emission spectra (310–400 nm) were calculated as described under Experimental Procedures. (B) Intrinsic fluorescence intensity at 322 nm (λ_{max} of the native enzymes).

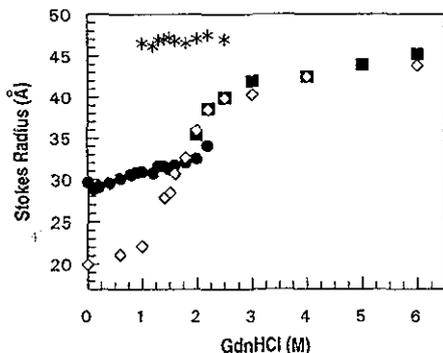


FIG. 7. Size-exclusion chromatography of TbTIM and the monomeric mutant protein at different concentrations of GdnHCl. Samples of TbTIM (●, *, and ■) and RMMO-1 TIM (◇) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) were incubated for 48 h at different concentrations of GdnHCl. Samples were then injected into a Superdex 75 column equilibrated with the same denaturant concentration. Stokes radii (R_s) were calculated from the elution volumes obtained according to Eq. [2] (see Experimental Procedures). TbTIM formed high-molecular-weight aggregates at concentrations of GdnHCl between 1.0 and 2.5 M (*). Between 1.0 and 1.8 M GdnHCl there are two R_s values for each GdnHCl concentration (● and *), which represent to D* and A, respectively. At 2.0 and 2.2 M three molecular species were observed (●, *, and ■) corresponding to D*, A, and M*, respectively. At 2.5 M, both M* and A are present, while from 3.0 to 6.0 M GdnHCl only the unfolding of M* (■) is observed.

two species that have important differences in their hydrodynamic properties (Figs. 7 and 8 and see below).

The first is a high-molecular-weight species (A), with a mean R_s of 46.7 \AA (Fig. 7, asterisk, between 1.0 and 2.5 M GdnHCl). Because the R_s value of A is slightly higher than that of the completely unfolded monomers of RMMO-1TIM and TbTIM, it is likely that A is formed by aggregated molecules. The second population has R_s values between those of the D* and A states. This species (M*) (Fig. 7, ■) appears at 2.0 M GdnHCl and coexists with D* at concentrations of 2.0 and 2.2 M (Figs. 7 and 8, see below). The R_s values of M* overlap with those obtained for the monomeric mutant RMMO-1TIM at concentrations between 1.8 and 6.0 M of GdnHCl (compare ■ and ◇ in Fig. 7); therefore, it is likely that M* is a monomeric intermediate.

In order to corroborate the association state of D*, M*, and A, SEC-FPLC profiles were also obtained at different TbTIM concentrations. Figure 8 shows representative elution profiles between 1.0 and 2.5 M of GdnHCl, with 5, 50, and $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ of TIM. The dominant state depends on the concentrations of both TbTIM and denaturant. At $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ TIM D* is the dominant form at 1.2 and 1.8 M GdnHCl (Figs. 8A and 8B), whereas M* is the most favored state in 2.0, 2.2, and 2.5 M GdnHCl (Figs. 8C–8E). We proposed that A

is formed by aggregated molecules and, in agreement with this proposal, when TIM concentration was increased to 50 and $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, A became the dominant state in the concentration range between 1.8 and 2.5 M GdnHCl (Figs. 8B–8E).

Although the analysis of the interconversion between D* and M* is complicated by the off-pathway formation of A, there is a clear dependence of the ratio $[D^*]/[M^*]$ on protein concentration calculated with the peak areas for D* (aD^*) and M* (aM^*). Thus, at 2.0 M GdnHCl, aD^*/aM^* ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) = 1, and aD^*/aM^* ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) = 1/3. At 2.2 M GdnHCl this dependence on protein concentration is even more evident: aD^*/aM^* ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) = 1/3 and aD^*/aM^* ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) = 1/10. This behavior is in agreement with the proposed association state of the intermediates. It is noteworthy that at GdnHCl concentrations higher than 1.8 M, the R_s for the dimeric intermediate is smaller than that of the monomeric intermediate. However, this transition is also accompanied by large changes in the CD and fluorescence spectra, suggesting that the monomer is considerably destabilized upon dissociation.

It is important to note that, although the D* to M* transition is complete when GdnHCl concentration reaches 2.5 M, M* continues to unfold beyond that GdnHCl concentration, since further changes in R_s , fluorescence, and CD are observed up to 2.5 M GdnHCl (Figs. 4, 6, and 7).

DISCUSSION

The Complex Unfolding of TbTIM

The data reported in this work show that the unfolding of TbTIM induced by GdnHCl is complex and irreversible. Irreversibility in the unfolding of TIM has been previously reported in the unfolding induced by heat of wt and monomeric mutants of TbTIM (29), in the unfolding promoted by GdnHCl of *Plasmodium falciparum* TIM (32), and in the unfolding of TIM from *Thermotoga maritima* induced by either heat or GdnHCl (48). In this work, the unfolding transitions of TbTIM induced by GdnHCl are also irreversible (Fig. 3); therefore, it is impossible to analyze our data using standard thermodynamic models.

Complete irreversibility was observed when unfolding was carried out between 1.0 and 2.0 M GdnHCl. SEC-FPLC experiments show that aggregates coexist with intermediates in this range of denaturant concentrations. The presence of aggregates increases with protein concentration and correlates with a decrease in the yield of TbTIM refolding (see Figs. 3, 7, and 8). Therefore, irreversibility is caused by the presence of high-molecular-weight aggregates that result from the nonnative association of D* and M*. Previous reports suggest that partially folded intermediates and molten

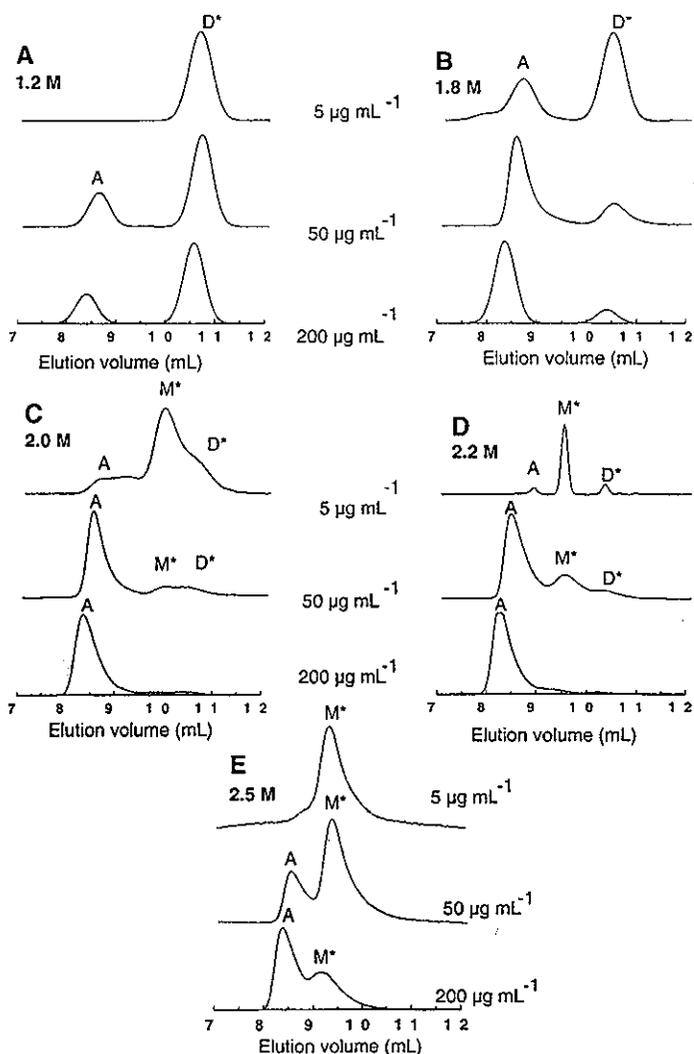
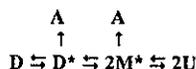


FIG. 8. Effect of the concentration of TbTIM on the equilibria between the D*, M*, and A states. Elution profiles were obtained after incubation of samples containing 5, 50, and 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of TIM at the indicated GdnHCl concentrations for 48 h. Samples were injected into a Superdex 75 column equilibrated with the same denaturant concentration. (A to E) Obtained at 1.2, 1.8, 2.0, 2.2, and 2.5 M GdnHCl, respectively.

globule intermediates are prone to aggregate (7-9). Even though the denaturation of *P. falciparum*, *T. maritima*, and *T. brucei* TIMs is irreversible, these studies have yielded important information about their unfolding processes.

Our data show that the unfolding of TbTIM induced by GdnHCl follows a complex mechanism:



The transition from D to D* corresponds to the first transition detected by catalytic activity and spectroscopic data and takes place from 0 to 1.8 M GdnHCl. It

involves the gradual expansion of the dimer (Fig. 7, ●) and is accompanied by loss of catalytic activity (Fig. 5B), the exposure of hydrophobic surfaces (Fig. 5A), and a 50% decrease in secondary structure (see Results and Fig. 4). Thereafter, in a narrow range of denaturant concentrations (from 2.0 to 2.2 M GdnHCl, Fig. 7), D^* dissociates to $2M^*$, and M^* is further transformed into completely unfolded monomers (between 2.2 and 3.0 M GdnHCl). The second transition detected by the spectroscopic techniques spans from 1.8 to 3.0 M GdnHCl (Figs. 4, 6A, and 6B) and has a $C_{1/2}$ value of 2.2 M GdnHCl (Table II). M^* is a monomeric intermediate, and this conclusion is supported by the observation that the hydrodynamic properties of M^* and those of the monomeric mutant RMM0-1TIM are very similar in a concentration range between 2.0 and 6.0 M of denaturant (Fig. 7, ■, ◇). In addition, the fraction of molecules in the M^* state increases with decreasing protein concentration (Figs. 8C–8E).

Therefore, the D^* to $2M^*$ and the $2M^*$ to $2U$ transitions detected by SEC-FPLC are both included in the second transition detected by spectroscopic techniques (Table II). As a consequence, the conformational changes that take place in each of these transitions cannot be assigned precisely. Nevertheless, it is clear that the transition of D^* to $2U$ involves a drastic expansion and the complete loss of secondary and tertiary structure. Notwithstanding the difference in association state between D^* and M^* , the R_g of both intermediates is similar; therefore, M^* is much more expanded than the monomers within D^* .

Single peaks with increasing R_g values were observed in the transitions from D to D^* and from M^* to U analyzed by SEC-FPLC. The absence of two discrete conformers in these transitions suggests that the exchange between D and D^* and that of M^* and U is faster than the time scale of the FPLC runs (43, 49).

High-molecular-weight aggregates (A) were detected by SEC-FPLC at concentrations between 1.0 and 2.5 M GdnHCl. The population of D^* decreases and that of A rises with increasing protein concentration (Figs. 8A and 8B). It is likely that the transformation between D^* and/or M^* to A follows a nonproductive irreversible pathway (compare Figs. 3 and 8).

Analysis of Fluorescence Data

Intrinsic fluorescence has been used in all the reports that deal with the equilibrium unfolding of TIM. All the TIMs previously studied have multiple Ws. The presence of more than one W residue limits the interpretation of fluorescence data, since the observed signal corresponds to the average properties of different W residues. In other proteins, this problem has been solved by site-directed mutagenesis, replacing W residues with Y or F (37, 50). In this work, we followed this

rationale and constructed several TbTIM mutants where F replaced W residues. The secondary, tertiary, and quaternary structure of native TbTIM are preserved in W12F and W12F/W193F, as evidenced by the similarity in catalytic parameters, CD, and intrinsic fluorescence spectra of the native enzymes (Table I, Fig. 1). However, the unfolding patterns followed by CD and IF show that the presence of the plateau region increases in the order TbTIM < W12F < W12F/W193F (Figs. 4 and 6A). The same order was observed in ANS binding (Fig. 5A). These data suggest that the native state was destabilized relative to the intermediate state, after mutating W12 to F and also in the double mutant W12F/W193F. The highest value of ANS fluorescence observed in the W12F/W193F double mutant indicates either that the intermediate state(s) in this mutant are less packed than those of the wt TbTIM or that the population of the W12F/W193F intermediates could be larger than that observed for the wild-type enzyme. These findings indicate that the susceptibility of the protein to denaturants increases with the number of W substitutions. For example, the W12F/W90Y/W159F/W193F mutant, which contains only the catalytic loop W170 (Fig. 2) was overexpressed and purified. However, the yield was very low and the enzyme had only residual activity ($10\text{--}30 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) and was prone to aggregation.

The finding that the fluorescence intensity of W12F is lower than that of W12F/W193F indicates that in both W12F and TbTIM, a W residue is quenched by W193. The distance between W159 and W193 (6.1 Å) suggests that W159 is the quenched residue. This conclusion is supported by the fact that fluorescence intensity of the W159F mutant and that of TbTIM are very similar (Fig. 1B). Therefore, fluorescence changes in the denaturation of wt TbTIM are mainly due to the exposure of the buried residues W12 and W170 since fluorescence of W159 is quenched by W193, whereas W90 and W193 are solvent exposed. Consequently, and assuming the same unfolding mechanism for wt TbTIM and the mutants, the unfolding pattern of the W12F mutant should reflect mainly the exposure of W170. Also, since the quencher W193 is absent in the W12F/W193F mutant, all fluorescence changes during the unfolding of this enzyme, should mainly report the exposure of W159 and W170. Although W12F shows two transitions, the amplitude of the first one is small; therefore, it was not detected by the Savuka program (45). The main change in fluorescence intensity in the unfolding of W12F is observed between 1.4 and 3.0 M GdnHCl (Fig. 6B). Since the main contribution to the fluorescence intensity of W12F mutant comes from W170, this suggests that the environment near this W, located in the catalytic loop, is severely modified in the transition from $2M^* \rightleftharpoons 2U$.

The unfolding profile of wt TbTIM shows two transitions: one with a midpoint around 1.2 M GdnHCl and the second, which is observed in both wt TbTIM and W12F, with a midpoint at 2.2 M GdnHCl (Table II). This suggests that W12 becomes exposed during the first transition from D to D*, because the difference in fluorescence between W12F and TbTIM is due to the exposure of W12.

Finally, the unfolding of W12F/W193F shows two transitions that should reflect the exposure of residues 159 and 170. Since W170 is mainly exposed in the second transition (see above), it is likely that the difference between wt TbTIM and the W12F/W193F mutant during the first transition, from D to D*, is due to the exposure of W159 (located in a short 3_{10} helix before β strand 6, Fig. 2).

Comparison of the Unfolding Pattern of Homologous TIM

Because the tertiary and quaternary structures of TIM from several species are essentially identical (51), TIM is an excellent model to study the evolution in folding mechanisms. Indeed, the denaturation patterns of TIM from several species can be compared to determine the invariant properties in the denaturation of this fold. Transient folding intermediates of TIM have been detected by following the kinetics of refolding (23, 24). On the other hand, most equilibrium studies have reported a two-state behavior. The unfolding of human TIM (28), *P. falciparum* TIM (32), and γ TIM (33) induced by urea, as well as the unfolding of *Leishmania mexicana* TIM in GdnHCl (36), show monophasic transitions. In contrast, equilibrium-folding intermediates have been detected in the GdnHCl induced unfolding of *P. falciparum* TIM (32), γ TIM (33, 35), and *L. mexicana* TIM at pH extremes (36).

In this work, we observed for the first time the presence of two intermediates in the unfolding of TbTIM induced by GdnHCl. Our results, also explain the irreversibility of the process in terms of the presence of aggregates, presumably formed by the wrong association of partially folded intermediates observed in other proteins (9).

Previous reports show that the denaturation pattern of γ TIM induced by GdnHCl is monophasic (33, 35). Both γ TIM and the W12F/W193F TbTIM mutant have three W residues located in equivalent positions (Table I); however, the results obtained in this work demonstrate the presence of two folding intermediates. This indicates that in spite of the 49% sequence identity between both TIMs, the 100% conservation of the active site, and the practical identity in the superposition of both structures (51), the stability of the intermediates is different in the two proteins. The variability observed in the monomer-monomer interface of homol-

ogous TIMs (14, 51) may be responsible for the differences in unfolding behavior. The unfolding of γ TIM is reversible (33, 35) whereas that of TbTIM is not. The aggregation of TbTIM intermediates may be related to the nonpolar character of the TbTIM interface when compared to that of γ TIM (51).

It is reasonable to think that homologous proteins that function in different cellular compartments could differ in their folding pathways. TbTIM is a glycosomal protein. The glycosome is a typical microbody of trypanosomatids like *T. brucei*, *T. cruzi*, and *L. mexicana* (52, 53). Several proteins of the glycolytic pathway are inside the glycosome. Apparently they are synthesized in the cytosol in their mature form and transferred to the glycosome without any apparent modification (53). It has been proposed that the information required for the transfer to the glycosome is contained in the primary structure and that positive charge hot spots are present in glycosomal proteins (54). It is possible that the folding intermediates observed in TbTIM may have a functional role in the transport of TIM to the glycosome. In order to support this hypothesis, a detailed characterization of the folding intermediates observed in TbTIM and the study of the folding pathway of TIM from other trypanosomatids is needed.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Arturo Rojo-Domínguez for the calculations of the solvent accessible surface areas of the tryptophan side chains Dr. Rafael Zubillaga-Luna and Dr. Enrique García for their help in CD measurements and discussion of the CD data, Hugo Nájera-Peña for his valuable and professional collaboration and discussion of the SEC-FPLC experiments, and Jorge Ramírez and Gerardo Pérez for technical support. We also thank Dr. Armando Gómez-Puyou and Dr. Andrés Hernández-Arana for valuable discussions, suggestions, and revision of the manuscript.

REFERENCES

1. Jaenicke, R., and Rudolph, R. (1989) *in* Protein Structure: A Practical Approach (Creighton, T. E., Ed.), pp. 191-223, IRL Press, Oxford, England.
2. Fersht, A. (1999) Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, Freeman, New York, NY.
3. Pace, C. N. (1986) *Methods Enzymol.* **131**, 266-282.
4. Garel, J. R. (1992) *in* Protein Folding (Creighton, T. E., Ed.), pp. 405-454, Freeman, New York, NY.
5. Jaenicke, R. (1996) *Curr. Top. Cell. Regul.* **34**, 209-314.
6. Jaenicke, R., and Lillie, H. (2000) *Adv. Protein Chem.* **53**, 329-401.
7. Hammarström, P., Persson, M., Freskgård, P. O., Martensson, L. G., Andersson, D., Jonsson, B. H., and Carlsson, U. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32897-32903.
8. Uversky, V. N., Segel, D. J., Doniach, S., and Fink, A. L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5480-5483.
9. Fink, A. L. (1998) *Fold. Des.* **3**, R9-R23.

10. Knowles, J. R., and Alberty, W. J. (1977) *Accounts Chem. Res.* **10**, 105-111.
11. Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A. C., and Martial, J. A. (1993) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **49**, 403-417.
12. Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Velleux, F. M. D., Martial, J. A., and Hol, W. G. J. (1995) *Protein Sci.* **4**, 2594-2604.
13. Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K., and Maes, D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2199-2206.
14. Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Dao Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1999) *Proteins* **37**, 441-453.
15. Walden, H., Bell, C. S., Russell, R. J. M., Siebers, B., Hensel, R., and Taylor, G. L. (2001) *J. Mol. Biol.* **306**, 745-757.
16. Lols, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., and Petsko, G. A. (1990) *Biochemistry* **29**, 6609-6618.
17. Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., and Hol, W. G. J. (1991) *J. Mol. Biol.* **220**, 995-1015.
18. Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaran, H., Balaran, P., and Murthy, M. R. N. (1997) *Structure* **5**, 751-761.
19. Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Pérez-Montfort, R. (1998) *J. Mol. Biol.* **283**, 193-203.
20. Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vried, G., Backmann, J., Michels, P. A. M., Lambeir, A. M., and Wierenga, R. K. (1999) *Protein Eng.* **12**, 243-250.
21. Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G. (1975) *Nature* **255**, 609-614.
22. Mande, S. C., Mainfroid, V., Kaik, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., and Hol, W. G. (1994) *Protein Sci.* **3**, 810-821.
23. Waley, S. G. (1973) *Biochem. J.* **135**, 165-172.
24. Zabori, S., Rudolph, R., and Jaenicke, R. (1980) *Z. Naturforsch.* **35c**, 999-1004.
25. Borchert, T. V., Pratt, K., Zeelen, J. P., Callens, M., Noble, M. E., Opperdoes, F. R., Michels, P. A., and Wierenga, R. K. (1993) *Eur. J. Biochem.* **211**, 703-710.
26. Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1515-1518.
27. Borchert, T. V., Zeelen, J. Ph., Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1995) *FEBS Lett.* **367**, 315-318.
28. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beaugregard, M., Frère J. M., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A., and Goraj, K. (1996) *J. Mol. Biol.* **257**, 441-456.
29. Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K. (1997) *Biochemistry* **36**, 9655-9662.
30. Kohlhoff, M., Dahm, A., and Hensel, R. (1996) *FEBS Lett.* **383**, 245-250.
31. Mainfroid, V., Mande, S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A., and Goraj, K. (1996) *Biochemistry* **35**, 4110-4117.
32. Gokhale, R. S., Ray, S. S., Balaran, H., and Balaran, P. (1999) *Biochemistry* **38**, 423-431.
33. Vazquez-Contreras, E., Zubillaga, R. A., Mendoza-Hernandez, G., Costas, M., and Fernandez-Velasco, D. A. (2000) *Protein Peptide Lett.* **7**, 57-64.
34. Rietveld, A. W. M., and Ferreira, S. T. (1998) *Biochemistry* **37**, 933-937.
35. Morgan, C. J., Wilkins, D. K., Smith, L. J., Kawata, Y., and Dobson, C. M. (2000) *J. Mol. Biol.* **300**, 11-16.
36. Lambeir, A. M., Backmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursuila, I., Norledge, B. V., and Wierenga, R. K. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 2516-2524.
37. Royer, C. A., Mann, C. J., and Matthews, C. R. (1993) *Protein Sci.* **2**, 1844-1852.
38. Saab-Rincon, G., Juarez, V. R., Osuna, J., Sanchez, F., and Soberon, X. (2001) *Protein Eng.* **14**, 149-155.
39. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
40. Bohm, G., Muhr, R., and Jaenicke, R. (1992) *Protein Eng.* **5**, 191-195.
41. Johnson, W. C. (1999) *Proteins* **35**, 307-332.
42. Gao, X. G., Garza-Ramos, G., Saavedra-Lira, E., Cabrera, N., De Gomez-Puyou, M. T., Perez-Montfort, R., and Gomez-Puyou, A. (1998) *Biochem. J.* **332**, 91-96.
43. Uversky, V. N. (1993) *Biochemistry* **32**, 13288-13298.
44. Lee, B., and Richards, F. M. (1971) *J. Mol. Biol.* **55**, 379-400.
45. Bilsel O., Zitzewitz, J. A., Bowers, E., and Matthews C. R. (1998) *Biochemistry* **38**, 1018-1029.
46. Pitsyn, O. B., Pain, R. H., Semisotnov, G. V., Zerovnik, E., and Razgulyaev, O. I. (1990) *FEBS Lett.* **262**, 20-24.
47. Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F., and Gilmanshin, R. I. (1991) *Biopolymers* **31**, 119-128.
48. Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B., and Jaenicke, R. (1997) *Protein Sci.* **6**, 2159-2165.
49. Uversky, V. N., and Pitsyn, O. B. (1996) *J. Mol. Biol.* **255**, 215-228.
50. Eftink, M. R. (1994) *Biophys. J.* **66**, 482-501.
51. Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., and Davenport, R. C. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 1115-1126.
52. Opperdoes, F. R., and Borst, P. (1977) *FEBS Lett.* **80**, 360-364.
53. Opperdoes, F. R., Baudhuin, P., Coppers, I., De Roe, C., Edwards, S. W., Weijers, P. J., and Missot, O. (1984) *J. Cell. Biol.* **98**, 1178-1184.
54. Hart, D. T., Baudhuin, P., Opperdoes, F. R., and de Duve, C. (1987) *EMBO J.* **6**, 1403-1411.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**